

**DÉVELOPPEMENT D'UN BIOCAPTEUR À
APPLICATION ENVIRONNEMENTALE FABRIQUÉ
PAR IMPRESSION TRIDIMENSIONNELLE**

par

Mélissa GAUDREAULT

Mémoire présenté au Département de chimie
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ des SCIENCES,
UNIVERSITÉ de SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, avril 2018

Le 17 avril 2018

*le jury a accepté le mémoire de Madame Mélissa Gaudreault
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeur Jérôme Claverie
Directeur de recherche
Département de chimie

Professeur Pedro A. Segura
Membre interne
Département de chimie

Professeure Gessie Brisard
Présidente rapporteuse
Département de chimie

SOMMAIRE

Les recherches décrites dans ce mémoire visent la conception d'une nouvelle gamme de biocapteurs analytiques fabriqués par impression tridimensionnelle, permettant de faire facilement la détection de plusieurs composés, tant au niveau environnemental que pharmaceutique. Les biocapteurs se retrouvent parmi les nouvelles technologies d'analyses favorisant une utilisation simple. Certains d'entre eux sont déjà reconnus et utilisés par une grande partie de la population, tels que les glucomètres pour la détermination du taux de sucre dans le sang.

Les biocapteurs peuvent être fabriqués par impression tridimensionnelle (3D) de matériaux thermoplastiques en mode dépôt de fil en fusion, FDM « fused deposition modeling ». L'impression 3D est une technique qui évolue rapidement et qui permet d'entrevoir des possibilités pour la fabrication d'une vaste gamme de biocapteurs via une étape de fabrication unique. La fabrication par impression 3D est accessible, peu coûteuse, rapide et peut s'accomplir en une seule étape pour plus d'un matériel à la fois dans un même système, ce qui augmente le potentiel d'application. De plus, ce type de conception offre une grande flexibilité et permet ainsi d'accélérer les développements dans le domaine des biotechnologies. Selon les besoins, la fabrication peut aussi être effectuée sur le site d'analyse, ce qui facilite les campagnes d'échantillonnage.

Dans l'objectif de démontrer l'efficacité de l'approche, le développement d'un biocapteur permettant de quantifier les cyanotoxines dans l'eau est entrepris. La contamination par les cyanotoxines est due à la présence des algues bleues dans l'eau. Ceci est problématique dans plusieurs pays, car elles sont toxiques et elles sont un danger potentiel pour la santé publique si elles se retrouvent dans l'eau potable. Il est possible d'effectuer des analyses en laboratoire pour quantifier les cyanobactéries et leurs toxines, toutefois, ces analyses sont longues et coûteuses. Ce dispositif permettra donc une détection directement au plan d'eau contenant des algues bleues. L'utilisation simple et rapide donnera un résultat significatif de la quantité de cyanotoxines présentes.

Les résultats de recherche présentés indiquent que l'impression tridimensionnelle de thermoplastiques permet de concevoir des objets sur mesure. En effet, des systèmes fluidiques, c'est-à-dire qui possèdent des canaux, peuvent être fabriqués en fonction des besoins de l'application. Cette technique de fabrication est donc adéquate pour créer des dispositifs pouvant être convertis en biocapteur. La conversion s'effectue en ajoutant des composés biologiques, comme des anticorps par exemple, dans le dispositif. Ce sont ces composés biologiques qui permettront la détection des analytes par l'entremise d'un mécanisme d'interaction significatif avec celui-ci. Dans la présente recherche, la toxine joue le rôle de l'antigène dans l'interaction avec un anticorps spécifique.

Il existe plusieurs manières d'intégrer les composés biologiques dans le dispositif. La technique présentée dans ce projet consiste à immobiliser les composés biologiques à l'aide d'un lien covalent à l'intérieur des canaux du dispositif. Ceci permet de fonctionnaliser les thermoplastiques. Le processus de fonctionnalisation est possible lorsque les groupements fonctionnels disponibles du thermoplastique possèdent une réactivité adéquate. Ces groupements doivent permettre la formation d'un lien covalent entre le thermoplastique et le composé biologique. Dans ce projet, la fonctionnalisation étudiée se fera par la formation d'un lien amide entre le thermoplastique et l'anticorps. Des thermoplastiques possédant des motifs polymériques adéquats pour former cette liaison seront présentés. En outre, un autre thermoplastique possédant les groupements appropriés a été synthétisé en laboratoire spécifiquement pour ce projet et celui-ci sera aussi évalué.

Grâce aux multiples possibilités pour réaliser la fonctionnalisation des composés biologiques sur des thermoplastiques, le développement d'un biocapteur fabriqué par impression tridimensionnelle est donc réalisable. De plus, de tels biocapteurs peuvent être adaptés pour une application environnementale. Cette approche pourra ensuite être étendue pour des applications variées dans des domaines touchant à la santé et au développement pharmaceutique.

Mots clés : Biocapteur, impression tridimensionnelle, *fused deposition modeling*, cyanobactérie, environnement, thermoplastique, chimie de surface, anticorps.

REMERCIEMENTS

La recherche présentée dans ce mémoire ainsi que la rédaction de celui-ci ont été grandement facilitées par le soutien de plusieurs personnes.

Je voudrais d'abord remercier M. Olivier R. Bolduc pour ses innombrables idées de recherches, la formation sur de nouvelles techniques et surtout pour sa confiance dans le laboratoire.

Ensuite, j'aimerais souligner la reconnaissance que j'ai pour le professeur Jérôme Claverie qui a accepté de me soutenir sans hésitation pour parfaire ce projet. Ses contributions intellectuelles et scientifiques ont beaucoup apporté à l'avancement des travaux.

Je remercie également René Gagnon, Michel Trottier et Nicole Wilb de la Faculté des Sciences, Sonia Blais et Charles Bertrand du Centre de Caractérisation des Matériaux (CCM) ainsi que Mado Poulin et Éric Leclerc du Centre de Technologie Minérale et de Plasturgie inc. (CTMP) pour leur contribution et leur aide précieuse au cours de ma maîtrise.

Je désire aussi remercier la Pre Gessie Brisard ainsi que le Pr Pedro Alejandro Segura qui ont accepté d'examiner ce mémoire. Un grand merci à mes collègues universitaires, mes amis et ma famille qui m'ont apporté un soutien important durant mon parcours.

Finalement, le tout n'aurait pas été possible sans la précieuse participation des différents organismes comme le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG), la Faculté des sciences de l'Université de Sherbrooke, le Centre québécois sur les matériaux fonctionnels (CQMF) et la Chaire de recherche du Canada en chimie des matériaux organiques et hybrides avancés.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	III
REMERCIEMENTS.....	V
TABLE DES MATIERES.....	VI
LISTE DES TABLEAUX.....	VIII
LISTE DES FIGURES	X
LISTE DES ACRONYMES ET SYMBOLES	XIII
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 : PROBLÉMATIQUE	6
1.1. <i>Description des cyanobactéries</i>	<i>6</i>
1.2. <i>Cas d'intoxication.....</i>	<i>7</i>
1.3. <i>Présence à travers le monde</i>	<i>9</i>
1.4. <i>Réglementation</i>	<i>11</i>
1.5. <i>Microcystine-LR.....</i>	<i>12</i>
1.6. <i>Traitement des eaux</i>	<i>15</i>
1.7. <i>Méthodes d'analyses disponibles</i>	<i>21</i>
1.8. <i>Méthodes d'analyses en développement.....</i>	<i>23</i>
CHAPITRE 2 : THÉORIE.....	37
2.1. <i>Biocapteurs.....</i>	<i>37</i>
2.2. <i>Fonctionnalisation.....</i>	<i>42</i>
2.3. <i>Hydrolyse des esters.....</i>	<i>44</i>
2.4. <i>Polymérisation radicalaire en émulsion</i>	<i>45</i>
2.5. <i>L'impression 3D.....</i>	<i>48</i>
CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIE.....	51
3.1. <i>Sélection des thermoplastiques</i>	<i>51</i>
3.2. <i>Modification de polymères commerciaux en vue d'effectuer la fonctionnalisation.....</i>	<i>54</i>
3.3. <i>Synthèse de copolymère en laboratoire pour la fonctionnalisation</i>	<i>57</i>
3.4. <i>Fonctionnalisation biologique</i>	<i>62</i>
3.5. <i>Techniques de caractérisation</i>	<i>64</i>
3.6. <i>Mise en filament de thermoplastique</i>	<i>69</i>
3.7. <i>Conception assistée par ordinateur</i>	<i>71</i>
3.8. <i>Imprimante 3D.....</i>	<i>71</i>
CHAPITRE 4 : DÉVELOPPEMENT D'UNE SURFACE DE FONCTIONNALISATION.....	79
PARTIE 1 : FONCTIONNALISATION D'UN THERMOPLASTIQUE COMMERCIAL.....	79
PARTIE 2 : DEVELOPPEMENT D'UN COPOLYMERE THERMOPLASTIQUE	102
CHAPITRE 5 : CAPACITES DE L'IMPRIMANTE 3D ET AMELIORATIONS.....	114
5.1. <i>Modules de déposition</i>	<i>114</i>
5.2. <i>Surface d'impression</i>	<i>117</i>

5.3. Précision de l'impression	118
5.4. Programmation de l'imprimante	121
5.5. Rétraction	121
CHAPITRE 6 CONCEPTION DU DISPOSITIF	123
6.1. Dessin 3D par ordinateur.....	123
6.2. Impression 3D	125
6.3. Optimisation individuelle de l'impression des thermoplastiques	126
6.4. Impression simultanée des thermoplastiques	126
6.5. Post-traitement.....	127
6.6. Efficacité de l'impression.....	128
6.7. Conversion du dispositif en biocapteur	129
CONCLUSION	130
ANNEXES.....	133
REFERENCES.....	144

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Compilation de la présence mondiale de microcystines dans les étendues d'eau.	10
Tableau 2. Exemples d'analyses accessibles des cyanobactéries ou cyanotoxines.....	22
Tableau 3. Comparaison de supports existants pouvant être utilisés dans la conception de biocapteurs.....	49
Tableau 4. Propriétés du filament thermoplastique de In-PLA de Taulmann 3D [124] ...	52
Tableau 5. Observation de l'écoulement du filament de P(MMA-EA).	81
Tableau 6. Réglage des paramètres d'impression du P(MMA-EA).....	81
Tableau 7. Conditions d'hydrolyse des surfaces de P(MMA-EA).....	84
Tableau 8. Résultats de l'efficacité de l'hydrolyse déterminés par la méthode colorimétrique.....	90
Tableau 9. Résultats obtenus par XPS pour l'hydrolyse de plaquettes de P(MMA-EA). .	93
Tableau 10. Résultats obtenus par XPS pour l'activation de plaquettes de P(MMA-EA).	95
Tableau 11. Résultats obtenus par XPS pour la liaison IgG sur les plaquettes de P(MMA- EA).....	97
Tableau 12. Résultats obtenus par XPS pour l'affinité biologique sur le P(MMA-EA)...	98
Tableau 13. Résultats de la fonctionnalisation sur les surfaces de P(MMA-EA-tBuAcr)	110

Tableau 14. Résultats de l'adsorption non spécifique des composés biologiques sur les surfaces de P(MMA-EA-tBuAcr).....	110
Tableau 15. Détermination de la température d'impression du filament de P(MMA-EA-tBuAcr).....	112
Tableau 16. Précision de l'impression de colonnes.....	119
Tableau 17. Précision de l'impression de canaux.....	119
Tableau 18. Précision de l'impression de cavités circulaires.....	119
Tableau 19. Précision de l'impression des cavités rectangulaires.....	120
Tableau 20. Valeurs de réglage des engrenages des modules en fonction du matériel associé.....	126

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Représentation de la cyanotoxine microcystine-LR (MC-LR). [48].....	13
Figure 2. Représentation de la structure de la protéine phosphatase 2A (PP2A) liée avec la MC-LR, en rose. [55]	14
Figure 3. Cellule de diffusion de type U contenant la double électrode d'or poreuse. [4]	24
Figure 4. A : Disque compact montrant les 8 sections, dont une encadrée. Elles possèdent 6 régions de 4 zones de détections chacune. B : Disque compact après 8 minutes en position verticale sur lequel a été ajouté 10µL de solution à chaque région. [5]	26
Figure 5. Analyse portable de trace de contaminants organiques. a) Schéma des composantes. b) Système portable. [6].....	27
Figure 6. Prototype NRL ; guide d'onde, mécanisme optique et système de transport. [102]	29
Figure 7. (A) Schéma du principe de fonctionnement. (B) Photo de l'appareil. [69]	30
Figure 8. Représentation du système fluidique. [8]	32
Figure 9. Exemple de résultats obtenus pour la détection de MC-LR de différentes concentrations (C : contrôle, T : Test). [10]	34
Figure 10. Schéma de la bande absorbante de détection. [11].....	35
Figure 11. Représentation des parties d'un biocapteur	37
Figure 12. Schéma simplifié d'un anticorps	39
Figure 13. Schéma d'un anticorps étiqueté avec l'isothiocyanate de fluorescéine.	41

Figure 14. La chimie de EDC-NHS [115].....	43
Figure 15. Mécanisme d'hydrolyse d'un ester en condition acide.....	44
Figure 16. Mécanisme d'hydrolyse d'un ester en condition basique suivie d'un rinçage à l'eau.	45
Figure 17. Mécanisme d'hydrolyse d'un ester en condition basique suivi d'un rinçage acide.....	45
Figure 18. Représentation de l'acide polylactique (PLA).....	51
Figure 19. Exemple de séquence de détection immunologique.....	63
Figure 20. Appareil d'impression 3D HYREL SYSTEM 30M [143]	72
Figure 21. Représentation du copolymère P(MMA-EA). Plaquettes commerciales, m≈93% et n≈7%. Granules pour le filament imprimable, m≈88% et n≈12%.	83
Figure 22. Résultats obtenus par FTIR-ATR pour les différentes conditions expérimentées.	87
Figure 23. Comparaison des résultats FTIR-ATR entre quelques conditions expérimentales et des copolymères P(MMA-MAA) commerciaux.	87
Figure 24. Proposition du mécanisme d'hydrolyse du PLA [146].....	89
Figure 25. Photos du stéréomicroscope en épifluorescence des plaquettes de P(MMA-EA) après la réaction d'affinité. Objectif 20X.	100
Figure 26. Représentation du copolymère de P(MMA-EA-tBuAcr).	103
Figure 27. Fluidification sans pression selon la température pour les thermoplastiques a) P(MMA-EA-tBuAcr) et b) P(MMA-EA).....	106

Figure 28. Photos du stéréomicroscope en épifluorescence de trois plaquettes de P(MMA-EA-tBuAcr) après la biofonctionnalisation sans hydrolyse. Objectif 5X.	109
Figure 29. Modification des pointes d'impression par affûtage. Rouge : nouveau diamètre Noir : diamètre d'origine	116
Figure 30. Dessin par ordinateur des canaux.	124
Figure 31. Dessin par ordinateur de la fenêtre de détection.	124
Figure 32. Dessin par ordinateur combiné des toutes les parties du dispositif.	125
Figure 33. Dispositif imprimé en 3D avec In-PLA, P(MMA-EA) et PVA.....	127

LISTE DES ACRONYMES ET SYMBOLES

\$CAD	Dollar canadien	FDM	<i>Fused Deposition Modeling</i>
\$US	Dollar américain	FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
.STL	<i>Standard Tessellation Language</i>	FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
°	Degré	g	Gramme
°C	Degré Celsius	GOx	Glucose oxydase
µg	Microgramme	h.	Heure
µm	Micromètre	H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
3D	Tridimensionnel	H ₂ SO ₄	Acide sulfurique
ABS	Acrylonitrile butadiène styrène	HCl	Acide chlorhydrique
APTES	Amino-3 propyltriéthoxysilane	HIPS	Polystyrène à haut impact
ASA	Acrylonitrile styrène acrylate	HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
ATR	Réflexion totale atténuée	IgG	Immunoglobuline G
BSA	Albumine se sérum bovin	Inc.	Incorporée
C=O	Carbonyle	KCl	Chlorure de potassium
C _{1s}	Orbitale 1s du carbone	Kg	Kilogramme
CAO	Conception assistée par ordinateur	KH ₂ PO ₄	Phosphate de potassium monobasique
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>	KMnO ₄	Permanganate de potassium
CCD	Détecteur à transfert de charge	KPS	Persulfate de sodium
CCM	Centre de Caractérisation des Matériaux	ksi	kilolivre par pouce carré
CEAEQ	Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec	L	Litre
CH ₃	Méthyle	LA	Leucine-Alanine
ClO ₂	Dioxyde de chlore	lb	Livre
cm	Centimètre	LC-MS	Chromatographie liquide – Spectromètre de masse
cm ⁻¹	Nombre d'ondes	LD	Limite de détection
cm ²	Centimètre carré	Ldt.	<i>Limited</i>
cm ³	Centimètre cube	LR	Leucine-Arginine
COOH	Acide carboxylique	M	Molaire
CQMF	Centre québécois sur les matériaux fonctionnels	MC	Microcystine
CRSNG	Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada	MeOH	Méthanol
CTMP	Centre de Technologie Minérale et de Plasturgie inc.	min.	Minutes
Da	Dalton	mJ	Millijoule
DSC	Calorimétrie différentielle à balayage	mm	Millimètre
EA	Acrylate d'éthyle	mM	Millimolaire
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide	mm2	Millimètre carré
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>	MMA	Méthacrylate de méthyle
et al	Et les autres	mol	Mole
Etc.	<i>et cetera</i>	MPTMS	Méthacryloxypropyltriméthoxysilane
eV	Électron-volt	Ms	Milliseconde
		Mw	Masse molaire moyenne en masse
		N	Newton
		N.D.	Non déterminé / Non détectable
		N _{1s}	Orbitale 1s de l'azote

LISTE DES ACRONYMES ET SYMBOLES (SUITE)

Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O	Hydrogénophosphate de disodium heptahydraté	PP1, PP2A	Protéine phosphatase
NaCl	Chlorure de sodium	PTES	Phényltriéthoxysilane
NaHCO ₃	Bicarbonate de sodium	PU	Polyuréthane
NaOH	Hydroxyde de sodium	PVA	Alcool polyvinylique
NH ₂	Amine	R	Alkyle
NHS	N-hydroxysuccinimide	RMN ¹ H	Résonnance magnétique nucléaire de proton
nL	nanolitre	rpm	Rotation par minute
nm	Nanomètre	RR	Arginine-Arginine
NRL	<i>Naval Research Laboratory</i>	SDS	Dodécylsulfate de sodium
OMS	Organisation Mondiale de la Santé	t.a.	Température ambiante
OTES	Triéthoxyoctylsilane	TBO	Ortho-toluidine bleu
PBS	Tampon phosphate salin	t-Bu	tert-butyle
PC	Polycarbonate	tBuAcr	Acrylate de tert-butyle
PEEK	Polyétheréthercétone	T _d	Température de dégradation
PET	Polyéthylène téréphtalate	TDI	Apport quotidien toléré
PETG	Polyéthylène téréphtalate modifié au glycol	TFA	Acide trifluoroacétique
pH	Potentiel hydrogène	T _g	Température de transition vitreuse
pi	Pied	UV	Ultraviolet
PLA	Acide polylactique	XPS	Spectroscopie des photoélectrons
PMAA	l'acide polyméthacrylique	YM	Tyrosine-Méthionine
PMMA	Polyméthacrylate de méthyle	YR	Tyrosine-Arginine
PP	Polypropylène		

INTRODUCTION

Dans l'environnement, les sources d'eau suscitent l'intérêt de tous quant aux contaminants qui pourraient s'y trouver. Parmi ceux-ci, les cyanotoxines produites par les cyanobactéries, appelées communément algues bleues, sont devenues un problème dans plusieurs pays. Ces cyanotoxines ont des effets indésirables et comme leur nom l'indique, elles peuvent être toxiques lorsqu'elles sont présentes en grande quantité, que ce soit dans les diverses sources d'eau ou dans l'eau potable [1]. De plus, l'élimination des cyanobactéries et des toxines qu'elles contiennent requiert des techniques précises utilisées dans un ordre tout aussi précis en fonction de la concentration [2]. Il devient alors primordial de détecter et de quantifier ces substances dans l'eau. Des campagnes d'échantillonnage et des analyses de laboratoire, toutes deux longues et coûteuses, peuvent être effectués pour répondre aux besoins des consommateurs, des municipalités, des agriculteurs, etc.

Des biocapteurs peu coûteux et facile d'utilisation peuvent être développés afin d'améliorer l'accessibilité à de telles analyses. Un biocapteur est un outil analytique qui possède la capacité de transformer une information biochimique en un signal détectable et utilisable. Cette technologie s'appuie sur les interactions entre les composés biologiques contenus dans le biocapteur et les substances à analyser dans l'échantillon. Les biocapteurs font partie des nouvelles technologies d'analyses permettant une utilisation simple. Les consommateurs pourraient donc utiliser ce dispositif directement au plan d'eau susceptible de contenir des cyanotoxines. Différents modèles de biocapteurs ont fait l'objet de recherches récentes pour la détection des cyanotoxines, mais leur fabrication et leur utilisation comportent des inconvénients [3-12]. Certains de ces inconvénients peuvent être éliminés par l'utilisation de l'impression tridimensionnelle (3D) comme méthode de fabrication.

L'objectif global de ce projet de recherche vise donc la création d'une nouvelle famille de systèmes analytiques fabriqués par impression 3D. C'est une technique de fabrication subissant une récente évolution. Elle est accessible, peu coûteuse, rapide et permet d'utiliser en une seule étape plusieurs matériaux selon les fonctions à accomplir. Pour ce projet, la méthode de dépôt de fil en fusion, « fused deposition modeling (FDM) », sera utilisée. Cette méthode nécessite l'emploi de thermoplastiques possédant des propriétés de fluidification spécifiques. Un système analytique complet peut être composé de plusieurs matériaux différents (solubles, robustes, transparents, etc.) ce qui augmente le potentiel d'application sans nécessairement ajouter d'étape dans le processus de fabrication. De plus, cette approche offre une grande flexibilité pour effectuer simplement des modifications à un système existant, contrairement à la microfabrication traditionnelle impliquant des moules ou des masques. L'impression 3D peut aussi, au besoin, être effectuée au site d'analyse afin d'accélérer et de faciliter l'utilisation pour l'échantillonnage.

L'étude présentée constitue une preuve de concept que l'impression tridimensionnelle de thermoplastique est une méthode avantageuse qu'il est possible d'utiliser en recherche sur la fabrication des biocapteurs. Une fois le dispositif imprimé, il peut être couplé à un processus de biorecognition pour obtenir un biocapteur. Pour ce faire, des composés biologiques sont intégrés dans les canaux du dispositif. Afin d'obtenir un dispositif de détection viable et efficace, les composantes et les étapes de fabrication seront étudiées et optimisées séparément. Le développement global se divise donc en plusieurs objectifs spécifiques qui sont tous interreliés.

Les caractéristiques des cyanotoxines sont d'abord étudiées afin de déterminer un processus de biorecognition adéquat. Ces toxines peuvent interagir avec des anticorps [13, 14] et des enzymes [15-17]. Or, il sera expliqué dans cette étude que l'interaction avec des anticorps est un meilleur choix pour la détection des cyanotoxines. L'ajout de ces anticorps à l'intérieur du dispositif fluide permet donc d'en faire un biocapteur.

L'objectif suivant est d'étudier le signal que l'interaction entre la cyanotoxine et l'anticorps doit produire pour obtenir une bonne détection. Il sera expliqué que le choix d'un signal optique semble être une meilleure option pour cette preuve de concept.

Un autre objectif relié aux précédentes décisions est l'étude des caractéristiques que les thermoplastiques imprimables doivent posséder. Les thermoplastiques doivent être sélectionnés de manière stratégique pour la réalisation du projet. La nature des composés biologiques et la nature du signal produit influencent majoritairement le choix des thermoplastiques. Pour faciliter la conception, plusieurs thermoplastiques seront utilisés pour un même dispositif. Ils pourront être situés chacun à des endroits précis de manière à exploiter leurs différentes caractéristiques.

Plusieurs sous-objectifs découlent de celui qui précède. Des expérimentations ont été effectuées sur les thermoplastiques sélectionnés afin de vérifier si les caractéristiques répondent aux besoins de l'utilisation dans le dispositif. Principalement, ceux-ci doivent permettre le passage du signal optique, être facilement imprimables et surtout posséder la capacité de former une liaison avec les composés biologiques.

D'ailleurs, une importante partie de cette recherche consiste à étudier la méthode de liaison entre le thermoplastique et le composé biologique. Pour atteindre cet objectif, la formation d'un lien amide covalent peut être réalisée entre un groupement amine de l'anticorps et un groupement carboxylique du thermoplastique [18]. Or, la réactivité et la disponibilité de ce dernier groupement sur les thermoplastiques doivent être optimisées. Pour ce projet, deux directions ont été envisagées pour obtenir les résultats souhaités. L'hydrolyse de la surface de certains thermoplastiques commercialement disponibles a d'abord été expérimentée [19]. Ensuite, la synthèse d'un thermoplastique en laboratoire a été effectuée afin d'obtenir une surface adaptée au projet, qui possède la disponibilité et la réactivité désirées pour effectuer la liaison amide.

Pour vérifier l'efficacité des expérimentations de fonctionnalisation, un anticorps a été utilisé pour former la liaison covalente avec le thermoplastique. Lors de cette vérification,

un anticorps plus connu et plus accessible que celui spécifique aux cyanotoxines a été utilisé. Il s'agit de l'immunoglobuline G (IgG) [20]. Une fois l'optimisation de la liaison avec l'IgG effectuée, la technique pourra être transposée avec l'anticorps spécifique des cyanotoxines pour effectuer la détection désirée.

À partir du moment où les thermoplastiques ont été sélectionnés, l'objectif consistant à effectuer l'impression 3D a pu être entamé. Cet objectif débute par le dessin tridimensionnel du dispositif à l'aide d'un logiciel de conception assistée par ordinateur (CAO). Le système analytique doit être composé d'un réseau fluidique intégré dont une section sera responsable de la biodétection des cyanotoxines. Le dessin inclut trois parties importantes, soit la structure globale, les canaux et la section de détection. La structure doit pouvoir englober et supporter toutes les autres parties du dispositif. Elle doit être assez robuste pour que le système conserve son intégrité. Il doit y avoir des canaux permettant l'entrée des solutions menant à la section de détection et d'autres permettant la sortie des solutions. Pour ce projet, une disposition à deux canaux d'entrée a été choisie. Un canal d'entrée peut servir à la préparation du dispositif par l'injection des réactifs, tandis que l'autre peut servir à l'injection de l'échantillon seulement. Un seul canal de sortie sera ajouté à la suite de la section de détection. La section de détection sera donc au centre du dispositif. C'est à cet endroit que la surface interne du canal sera fonctionnalisée avec les composés biologiques.

Pour réaliser l'impression 3D, les capacités de l'imprimante ont été étudiées et compilées. Par la suite, afin de compléter l'objectif de l'impression du dispositif en 3D, le prototype dessiné par ordinateur a été imprimé.

La réalisation des différents objectifs décrits précédemment doit être effectuée de façon stratégique. Ce mémoire présente donc en détail les processus effectués pour la sélection de la cyanotoxine d'intérêt, de la molécule biologique de reconnaissance, du signal créé par la détection, des polymères thermoplastiques de chaque section du dispositif, de la compatibilité biologique générale entre le thermoplastique et le type de composé

biologique, de la conception du dispositif à l'ordinateur, les capacités de l'imprimante 3D, les résultats de l'impression du prototype, etc.

Chapitre 1 :

PROBLÉMATIQUE

1.1. Description des cyanobactéries

Les cyanobactéries, plus communément appelées algues bleues, se retrouvent dans les cours d'eau eutrophes où les conditions sont favorables à leur prolifération [21]. Ce sont des organismes vivants, de type procaryote, qui utilisent la lumière et le dioxyde de carbone pour faire de la photosynthèse [22]. À l'intérieur de leur paroi cellulaire, les cyanobactéries génèrent des toxines appelées cyanotoxines. Lorsqu'elles sont présentes en grande quantité, des agglomérations d'algues vertes bleutées sont visibles au bord des étendues d'eau contaminées.

1.1.1. Classification des cyanobactéries

Il existe plus de 150 types de cyanobactéries se déclinant en plus de 2000 espèces [23]. Celles-ci se divisent principalement en trois morphologies; les coccoïdes, les filamenteuses hétérocystes et les filamenteuses non-hétérocystes [24]. Les cyanobactéries coccoïdes, d'un diamètre d'environ 3 μm , ne fixent pas l'azote. Selon les espèces, elles peuvent être unicellulaires ou agglomérées en colonies. Dans la plupart des cas, ce sont les coccoïdes que l'on retrouve en concentration majoritaire dans les étendues d'eau contaminées. Les cyanobactéries filamenteuses hétérocystes sont celles qui ont une bonne capacité à fixer l'azote dans un environnement anaérobie. La taille des cyanobactéries filamenteuses est très variable autant en diamètre qu'en longueur. Celles hétérocystes ont des parois plus épaisses et un diamètre moyen pouvant varier de 10 à 25 μm selon les espèces. Le diamètre moyen de celles non-hétérocystes est de l'ordre de 5 μm [25].

1.1.2. Condition de prolifération

Les cyanobactéries prolifèrent mieux dans les étendues d'eau eutrophes, où la présence des nutriments tels que le phosphore et l'azote est élevée. L'eutrophisation des cours d'eau est accrue par l'utilisation de produits chimiques pour l'agriculture possédant ces nutriments. De plus, le réchauffement des cours d'eau permet une croissance favorable de ces bactéries, qui atteignent leur taux de croissance maximale vers 32°C [22, 26].

1.1.3. Relargage des toxines

Parmi les 150 types de cyanobactéries, environ 40 types produisent des substances à l'intérieur de leur paroi cellulaire pouvant être toxiques pour les êtres vivants, autant les animaux que les humains [27]. Les toxines appelées microcystines, anatoxines, nodularines, cylindrospermopsines et saxitoxines sont celles qui sont le plus fréquemment retrouvées et étudiées. Ces cyanotoxines peuvent être libérées en petite quantité dans le milieu aquatique tout au long de la vie de la bactérie. En plus de cela, c'est lors de la mort cellulaire ou lors du bris de la paroi que les cyanotoxines se retrouvent dans l'eau en grande quantité. Le bris de la paroi cellulaire peut s'effectuer selon le cycle normal de l'organisme ou lorsque celui-ci se retrouve en condition où la lyse est provoquée. Ces conditions peuvent survenir lors d'un traitement effectué sur l'eau qui a pour effet de briser cette paroi ou lors du passage dans l'estomac suite à l'ingestion.

1.2. Cas d'intoxication

Les cyanobactéries présentes dans les sources d'eau représentent un danger lorsqu'elles ne sont pas détectées et éliminées avant la consommation. Des épisodes majeurs

d'intoxication humaine ont été répertoriés à travers le monde [22]. Ces cas représentent des intoxications spontanées. Toutefois, il est important de mentionner qu'une intoxication peut survenir aussi de manière graduelle, suite à une exposition prolongée.

1.2.1. Brésil

En 1996, une centaine de personnes traitées en hémodialyse ont subi une insuffisance hépatique causée par l'eau contaminée [22]. Parmi celles-ci, cinquante personnes sont décédées. L'eau provenait d'un réservoir de la cité qui contenait des cyanobactéries. Les recherches subséquentes ont dévoilé la présence de l'espèce *cylindrospermopsis philippinensis*, qui produit des cyanotoxines de types neurotoxines. De plus, après l'événement, les appareils du centre de traitement ont été analysés et des cyanotoxines de type microcystine, telle que la microcystine-LR, ont été détectées dans une concentration de l'ordre de la partie par million. Les tissus des patients intoxiqués montraient également la présence de microcystines.

Deux ans plus tard, plus de 2000 cas de gastroentérite reliée à la consommation d'eau provenant d'un réservoir contaminé ont été recensés. De ce nombre élevé, 88 personnes sont décédées à l'intérieur d'une période de 42 jours. Ce dernier événement est le plus mortel à ce jour pour les cas reliés aux cyanobactéries. Les analyses ont révélé la présence de toxines provenant des cyanobactéries *anabaena* et *microcystis*. De plus, l'étude menée à la suite de ces événements a établi que les personnes intoxiquées avaient consommé de l'eau bouillie provenant du réservoir. L'explication de ceci et les effets des traitements de l'eau potable sur les cyanobactéries et leurs toxines sont présentés à la section 1.6.

1.2.2. Australie

En 1979, des habitants d'une petite région de l'Australie ont été intoxiqués suite à la consommation de l'eau provenant d'une même source [22]. Au moins 140 enfants et 10 adultes présentaient des symptômes de gastroentérite et de détérioration du foie. Pour ce cas, la présence d'une source de contamination causant des odeurs et un mauvais goût à l'eau était connue. L'eau avait donc été traitée au sulfate de cuivre quelques jours avant que les habitants ne soient malades. Le traitement effectué n'était donc pas adapté pour rendre l'eau potable. Le type de cyanobactérie présent dans ce cas était *cyndrospermopsis raciborskii*.

1.2.3. Angleterre

En 1989, lors d'un camp de l'armée, 10 de 20 recrues devinrent malades après s'être entraînées à la nage et au canot dans une eau contaminée au *microcystis spp*. Deux cas plus graves ont développé une pneumonie. [22]

1.3. Présence à travers le monde

La présence de cyanobactéries n'est pas seulement constatée dans les lieux discutés dans la section 1.2. En fait, c'est un problème d'ordre mondial. Le tableau 1 présente des domaines de concentration et des concentrations maximales en cyanotoxines, plus précisément les microcystines, détectées dans plusieurs sources d'eau. Les plans d'eau étudiés sont, pour la plupart, des sources servant à la production de l'eau potable et parfois des lacs servant aux activités récréatives.

Tableau 1. Compilation de la présence mondiale de microcystines dans les étendues d'eau.

Pays	Lieu	Toxines	Concentration (µg/L)	Année	Références
Allemagne	Lac Waters, Frankfurt	Microcystines	36	1993	[28]
	Wahnachtalsperre, Siegburg	Microcystine-LR (équivalent)	0,05 - 0,22	1999	[29]
Brésil	Réservoir Armando Ribeiro Gonçalves	Microcystines	8,8	2000	[30]
	Réservoir Utinga, Belém, Para	Microcystines	1,25	1999	[31]
Canada	Ferintosh plant, Alberta	Microcystines	2,28	1992	[32]
	Lac Little Beaver, Alberta	Microcystine-LR	11,2	1994	[33]
	Québec	Microcystine-LR (équivalent)	5,35	-	[34]
	Québec	Microcystine-LR (équivalent)	4,29	2001	[35]
Corée	Réservoir Gunsan	Microcystines	856	1995	[36]
États-Unis	Lac Oneida, New York	Microcystines	3,4	2003	[37]
France	Réservoir Saint-Caprais	Microcystine-LR (équivalent)	0,74	1999	[38]
Italie	Lac Albano	Microcystines	14,2	2004	[39]
Japon	Lac Kasumigaura	Microcystines	1300	1994	[28]
Pologne	Réservoir Sulejow	Microcystines	6,7	2002	[40]
Portugal	Rivière Douro, Melres, Ponte Canaveses	Microcystines	37	1994	[28]
République tchèque	-	Microcystines	58,47	1999	[41]
	-	Microcystine-LR	35,12	1999	[41]
Suisse	Lac Surich	Microcystine-LR (équivalent)	4,22 - 8,05	1999	[29]
Thaïlande	Chaing Mai	Microcystines	0,354	1994	[28]
Zimbabwe	Lac Chivero	Microcystine-LR	22,48	2003	[42]

Les données proviennent de différentes campagnes d'échantillonnage effectuées sur quelques années à travers le monde. Les concentrations présentées dans ce tableau sont pour les microcystines totales, donc celles intracellulaires et extracellulaires. Tel qu'indiqué dans ce tableau, certaines campagnes d'échantillonnage ont précisément

quantifié la microcystine-LR. D'autres groupes de recherche ont, quant à eux, présenté les résultats en équivalence de MC-LR pour représenter la toxicité de l'échantillon si la MC-LR avait été la seule microcystine présente. Les résultats permettent de constater que les microcystines sont présentes sur tous les continents. Lorsqu'un seul nombre est indiqué, ce sont les concentrations maximales mesurées lors des échantillonnages. Celles-ci sont très variables et il est important de préciser que les concentrations varient également sur un même site en fonction des saisons et des conditions météorologiques. Il est important de réglementer et de surveiller la concentration de ces toxines dans les lacs, car elles peuvent s'accumuler dans les autres organismes de l'étendue d'eau. Les poissons consommés ainsi que les algues prises comme suppléments peuvent devenir une source d'intoxication [43].

1.4. Réglementation

Suite aux cas d'intoxication présentés et aux multiples études sur la présence et les dangers des cyanobactéries et de leurs toxines, il devient important de surveiller la présence de ces organismes et des toxines qu'ils produisent. Plusieurs instances ont émis des réglementations pour l'eau potable et pour les eaux récréatives. En 1998, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a émis une valeur guide provisoire pour l'eau potable de 1 µg/L en microcystine-LR totale, ce qui englobe les toxines intracellulaires et les toxines libres [44]. Cette valeur guide a été déterminée à partir de l'apport quotidien toléré (TDI) de 0,04 µg/kg par jour rapporté dans la littérature [45]. En d'autres termes, une personne de 50 kg qui a accès à de l'eau potable contenant 1 µg/L de MC-LR a seulement besoin de consommer 2 litres en une journée avant d'atteindre l'apport maximal toléré. Ce volume d'eau représente une consommation normale d'un adulte. La valeur guide provisoire émise par l'OMS est par la suite devenue une valeur guide officielle [46]. En 2002, Santé Canada a établi un maximum tolérable de 1,5 µg/L pour la concentration en microcystine-LR dans l'eau potable [1]. En plus de l'eau potable, les eaux récréatives sont aussi soumises à une valeur guide de 20 µg/L [22]. Bien que la microcystine-LR ne traverse pas la peau [47],

cette valeur guide a été émise, car à de fortes concentrations, l'ingestion accidentelle de petites quantités d'eau peuvent s'avérer néfaste.

Le tableau 1 permet de constater que plusieurs sources d'eau brute dépassent ces réglementations. L'eau de ces sources sera traitée afin d'être consommée en tant qu'eau potable. Par contre, il sera discuté à la section 1.6 que les traitements ne sont pas tous efficaces pour rendre potable une eau contaminée aux cyanobactéries. Il devient donc essentiel de quantifier les cyanobactéries et leurs toxines avant et après les traitements pour l'eau potable.

Parmi les 84 sortes de cyanotoxines identifiées jusqu'à maintenant, la microcystine-LR a été choisie pour être ajoutée aux réglementations sur la qualité de l'eau. Cette toxine se retrouve le plus fréquemment dans les eaux contaminées et c'est celle-ci qui est présente le plus souvent en grande concentration. [22]

1.5. Microcystine-LR

Les microcystines sont des macrocycles heptapeptidiques possédant tous une structure similaire. La structure est décrite comme cyclo (- D-Alanine - L-**X** - (D-érythro - β -méthyl - D-acide aspartique) - L-**Y** - Adda - D-isoglutamate - N-méthyl-déhydroalanine). La partie Adda est composée d'acide (2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-méthoxy-2,6,8-triméthyl-10-phényldéca-4,6-diènonique. Les lettres **X** et **Y** représentent les acides aminés (L) qui distinguent les variantes de microcystines à la position 2 et 4 respectivement du macrocycle [22]. Cette diversité d'acides aminés permet d'obtenir plus de 100 variantes de microcystines. Comme plusieurs études l'indiquent, la cyanotoxine microcystine-LR (CAS 101043-37-2) génère une grande inquiétude, de par sa présence abondante et sa toxicité. Le suffixe LR indique la présence d'une leucine à la position 2 et d'une arginine à la position 4 du macrocycle (figure 1). Elle est produite par plusieurs cyanobactéries telles que : *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Aphanizomenon*, *Aphanocapsa*, *Cylindrospermopsis*,

Gloeotrichia, Hapalosiphon, Microcystis, Nostoc, Oscillatoria, Phormidium, Planktothrix, Pseudoanabaena, Synechococcus et Woronochinia.

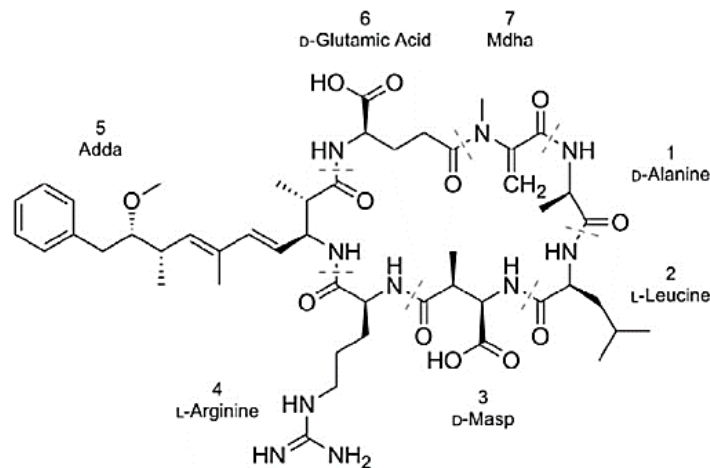


Figure 1. Représentation de la cyanotoxine microcystine-LR (MC-LR). [48]

1.5.1. Toxicité

Jusqu'à maintenant, il n'y a pas d'évidence que la MC-LR est cancérigène. Cette toxine est considérée comme étant potentiellement cancérigène (Classe 2B) [49]. De plus, bien qu'elle induise des anomalies chromosomiques dans certains cas, la MC-LR ne provoque pas de mutation génétique [50, 51]. La microcystine-LR est une cyanotoxine hépatotoxique. Cette toxicité découle de son action d'inhibition spécifique des protéines phosphatase de type PP1 et de type PP2A. Cette dernière PP2A est inhibée plus fortement et de manière non compétitive. La MC-LR se loge de manière irréversible dans la sous-unité catalytique de la protéine (figure 2) [52]. Cette liaison empêche la déphosphorylation des résidus sérine et thréonine dans l'unité de régulation. Cela a pour effet de causer l'altération de la structure des protéines associées au cytosquelette des hépatocytes présents

dans le foie. Les hépatocytes ne peuvent donc plus exercer leurs fonctions métaboliques normales, conduisant à un dysfonctionnement du foie et un choc hémorragique [53, 54].

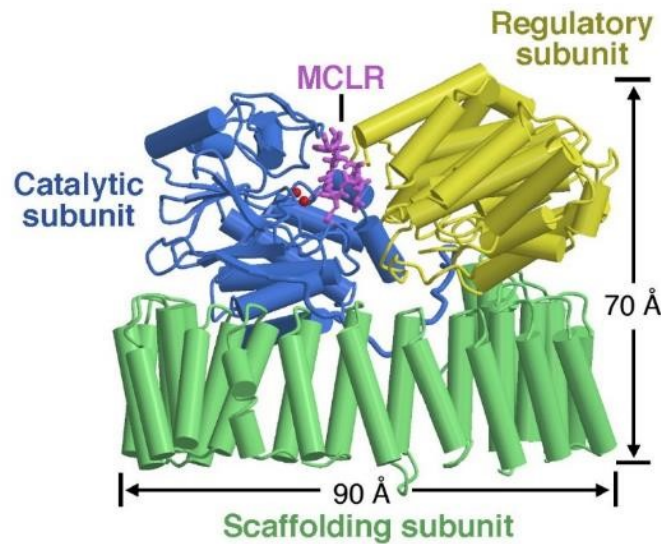


Figure 2. Représentation de la structure de la protéine phosphatase 2A (PP2A) liée avec la MC-LR, en rose. [55]

La microcystine-LR est toxique après ingestion, car elle n'est pas altérée ou détruite dans le système digestif. Elle est acheminée et accumulée dans les hépatocytes par des mécanismes de transport cellulaire du système [56]. Les symptômes d'une intoxication peuvent prendre plusieurs formes, comme des douleurs abdominales, nausées, vomissements, diarrhée, toux sèche, maux de tête, pneumonie, vertige, fatigue ou irritation de la gorge, de la peau ou des yeux. L'observation d'un ou de plusieurs de ces symptômes dépend de la gravité de l'intoxication.

Étant donné la présence quasi systématique de MC-LR dans les cours d'eau contaminés aux cyanobactéries, la détection de cette microcystine peut donner une bonne indication de la présence générale des cyanotoxines. Par contre, les autres variantes de microcystines peuvent aussi causer une élévation du caractère toxique de l'eau. Comme ces variantes ne sont pas réglementées, il est nécessaire de pouvoir évaluer la toxicité de l'eau contenant un mélange de microcystines afin d'obtenir une valeur pouvant être comparée à la réglementation. Au Québec, des équivalences en fonction de la MC-LR ont été établies

pour plusieurs variantes de microcystines. Les microcystines possédant les acides aminés LA (Leucine-Alanine), RR (Arginine-Arginine), YR (Tyrosine-Arginine) et YM (Tyrosine-Méthionine) ont une action inhibitrice similaire à la MC-LR. Les concentrations de ces quatre toxines doivent être rapportées en équivalence de MC-LR selon les facteurs de 1.0 (LA), 0.1 (RR), 1.0 (YR) et 1.0 (YM) [57].

1.6. Traitement des eaux

La plupart des contaminants présents lors de l’approvisionnement en eau sont éliminés par les procédés utilisés dans les usines de traitement d’eau.

Afin de rendre l’eau potable, il faut éliminer non seulement les cyanotoxines libres, mais aussi les cyanobactéries qui produisent et qui contiennent celles-ci. La présence de cyanobactéries résiduelles dans l’eau potable est problématique, car les cellules seront brisées dans notre estomac, libérant ainsi les toxines [43].

Cette section décrit l’efficacité des techniques courantes de traitement des eaux face à l’élimination des cyanobactéries et leurs toxines [2].

1.6.1. *Ébullition*

L’ébullition de l’eau est davantage une technique domestique qu’industrielle. Habituellement, cette méthode permet de dénaturer les microorganismes contenus dans l’eau. Par contre, porter à ébullition de l’eau contenant des cyanobactéries ne ferait que provoquer la lyse des cellules pour ainsi libérer les cyanotoxines, tel qu’expliqué à la section 1.1.3. Une augmentation de la toxicité de l’eau s’en suivrait. De plus, l’ébullition de l’eau ne permet pas de détruire ou de désactiver les molécules toxiques. En effet, la

microcystine-LR possède une température de dégradation autour de 300°C à pH neutre. [58, 59]

1.6.2. Décantation

La coagulation de la matière en suspension suivie d'une décantation peut s'avérer utile pour réduire la quantité de cyanobactéries au début d'une séquence de traitement. Cette technique n'est pas efficace pour éliminer les cyanotoxines déjà libérées dans le milieu. La coagulation demande parfois d'être adaptée en fonction de l'eau brute à traiter. Le bon coagulant doit être choisi et des aides à la floculation peuvent aussi être ajoutés. De plus, les produits doivent être sélectionnés et dosés de manière à ne pas causer la lyse des cyanotoxines, ce qui libérerait les molécules toxiques dans l'eau.

1.6.3. Flottation

La flottation est une technique peu utilisée. Elle peut servir à éliminer les cyanobactéries, sans risquer de provoquer la lyse, par l'ajout d'agent coagulant. Par contre, elle n'est pas efficace pour l'élimination des toxines dissoutes.

1.6.4. Rayonnement ultraviolet

Le rayonnement ultraviolet est reconnu pour provoquer la mort cellulaire. En effet, une dose assez forte de rayonnement ultraviolet occasionne des dommages aux cellules, menant à l'apoptose [60]. Par conséquent, les cyanotoxines se retrouvent libérées dans l'eau, ce qui cause une augmentation de la toxicité. Avec un rayonnement suffisamment puissant,

de 38 à 500 fois supérieur à celui utilisé habituellement (mJ/cm^2), les toxines pourraient toutefois être dénaturées. Souvent, les lampes utilisées pour produire le rayonnement ultraviolet n'ont pas une puissance suffisamment élevée pour causer la mort cellulaire ni pour éliminer les cyanotoxines.

1.6.5. Charbon activé

Le charbon activé peut adsorber une grande quantité de gaz et d'impuretés grâce à sa grande porosité et à sa surface spécifique élevée. Il existe plusieurs grades de charbon activé et seulement quelques-uns sont assez efficaces. Le charbon activé en grain possède la capacité d'adsorber les cyanobactéries. Le charbon activé en poudre ou en grain peut servir à l'élimination des anatoxines et de quelques microcystines dont la MC-LR, mais il n'est pas efficace pour l'élimination des autres cyanotoxines. De plus, il doit être utilisé en quantité très importante pour s'avérer efficace.

1.6.6. Filtration

La filtration est utilisée dans toutes les industries modernes de traitement des eaux. Elle permet d'éliminer les matières en suspension, autant les particules inorganiques que les résidus organiques. Les filtres utilisés habituellement dans les installations de traitement possèdent des tailles effectives d'environ $180\ \mu\text{m}$ [61]. Seuls les filtres possédant des pores inférieurs à $3\ \mu\text{m}$ pourraient contribuer à éliminer les cyanobactéries. Les cyanotoxines, quant à elles, sont des molécules plus petites. Les microcystines peuvent avoir un diamètre aérodynamique aussi petit que $0,2\ \mu\text{m}$ [62]. Les cyanotoxines présentes dans l'eau brute ne sont donc pas éliminées efficacement par la filtration.

La biofiltration pourrait être une méthode efficace si la biomasse bactérienne utilisée est capable de dégrader les toxines.

1.6.7. Produits oxydants

Les produits chlorés utilisés pour le traitement des eaux permettent de briser la paroi cellulaire. De même que pour les autres méthodes produisant ce résultat, la libération des cyanotoxines s'en suit. La chloration fonctionne à de faibles concentrations. Le pH peut être contrôlé entre 6 et 9 afin de cibler les différentes cyanotoxines à éliminer. Par contre, elle est moins efficace pour les différentes anatoxines. Les techniques utilisant la chloramine et le dioxyde de chlore (ClO_2) ne dénaturent pas les cyanotoxines se retrouvant dans l'eau. Le permanganate de potassium (KMnO_4), en plus de briser la paroi des cyanobactéries peut servir à éliminer la toxicité causée par les anatoxines et dans une moindre mesure celle causée par les microcystines. Par contre, son efficacité sur les cylindrospermopsines n'est pas complète [34]. Le peroxyde d'hydrogène est un autre produit oxydant pouvant être utilisé dans le traitement. Celui-ci n'est pas adéquat, car il occasionne seulement la lyse des cyanobactéries tout en laissant intactes les cyanotoxines. Il n'existe pas d'agent oxydant actuellement capable de dénaturer toutes les cyanotoxines.

1.6.8. Sulfate de cuivre

Comme les autres algicides utilisés pour le traitement des eaux, le sulfate de cuivre provoque la lyse des cyanobactéries, libérant ainsi les toxines dans le milieu. Il n'est donc pas recommandé d'utiliser les algicides en présence de cyanobactéries [63].

1.6.9. Ozone

Un traitement à l'ozone est une autre technique d'oxydation utilisée couramment pour dénaturer les microorganismes. Il sert à faire la lyse des bactéries et traiter plusieurs autres contaminants. C'est une bonne méthode pour éliminer la toxicité d'une vaste gamme de cyanotoxines en oxydant ces molécules [34]. Néanmoins, l'efficacité sur les saxitoxines n'est pas complète. Pour cette technique, il est important d'utiliser la bonne dose efficace selon la concentration en cyanotoxines.

1.6.10. Osmose inverse et nanofiltration

Ces deux méthodes de traitements sont reconnues comme étant les plus efficaces. Elles permettent l'élimination de 99% des cyanobactéries et de 95% des cyanotoxines. Il est dispendieux de les mettre en place dans les installations, surtout celles déjà existantes et d'une taille considérable. Les anatoxines, comme l'anatoxine-a, sont les plus petites cyanotoxines. Elles font donc partie des rares cyanotoxines non retenues par la nanofiltration.

1.6.11. Traitement industriel

À la lecture des sous-sections précédentes, il est possible de constater que plusieurs méthodes de traitement ne permettent pas d'éliminer efficacement toutes les cyanobactéries et toutes les cyanotoxines. Dans la majorité des cas, les traitements libèrent les cyanotoxines sans les éliminer par la suite. Il est donc important de créer une séquence de traitement adéquate en présence de cyanobactéries. Il n'est pas conseillé d'utiliser une méthode de prétraitement pouvant faire la lyse des cellules avant de procéder au retrait de

ces cellules par une méthode physique, comme la filtration ou par l'utilisation de charbon activé en grain. Un prétraitement inadéquat causant la lyse des cyanobactéries aurait pour conséquence d'augmenter la concentration en cyanotoxines libres. Les méthodes subséquentes servant à l'élimination des cyanotoxines libres nécessiteraient alors de plus grandes doses et concentrations.

Il est nécessaire de pouvoir analyser avec certitude les concentrations des cyanobactéries et de leurs cyanotoxines dans l'eau brute de manière à utiliser un traitement adéquat et efficace selon la qualité à la source. Les produits de traitement sont coûteux, il est donc avantageux de les utiliser selon les besoins réels de l'eau brute. Il va de soi que la concentration de ces contaminants doit de même être analysée à la fin du processus pour vérifier la qualité de l'eau potable produite. Les usines de production d'eau potable possédant à la fois un système de chloration et un traitement par l'ozone pourraient éliminer jusqu'à 60µg/L de microcystine-LR dans l'eau brute. Toutefois, ce ne sont pas toutes les usines de traitement qui utilisent une combinaison de ces deux méthodes. [2]

1.6.12. *Traitement de puits artésiens*

Les cyanobactéries et les toxines qu'elles contiennent peuvent se retrouver dans les puits artésiens. Les probabilités sont plus élevées pour les habitants des secteurs riverains, car lors de pluies abondantes, le sol se retrouve gorgé d'eau et l'épuration naturelle de l'eau qui entre dans les puits n'est plus aussi efficace [64]. Si ce phénomène se produit en bordure d'une étendue d'eau contaminée aux cyanobactéries, la probabilité de retrouver celles-ci dans les puits est augmentée. La présence de cyanobactéries dans la nappe phréatique desservant les puits artésiens est aussi possible [65]. Habituellement, l'eau des puits ne subit pas un traitement aussi élaboré et des analyses aussi régulières que dans les installations de traitement des eaux. En plus de cela, la détection des cyanotoxines ne fait pas partie des paramètres de base qu'il est recommandé d'analyser sur l'eau d'un puits. Les systèmes de traitement généralement retrouvés sont des dispositifs pour précipiter ou capter

les ions de fer et de manganèse ou pour équilibrer le pH. Ces filtres laissent passer les éléments de petite taille comme les bactéries. Lorsque l'eau pluviale est contaminée par des microorganismes, il est possible d'utiliser un système de filtration plus adéquat avec des pores de 1 micromètre et d'ajouter des dispositifs de désinfection UV, de charbon activé et d'osmose inverse [66, 67]. Par contre, il est primordial de savoir si des cyanobactéries sont aussi présentes dans l'eau, car les étapes de traitement doivent se faire dans un ordre précis et avec un temps d'exposition adéquat. Le traitement doit commencer par une ultrafiltration, suivi d'un passage à travers un dispositif de charbon activé. L'utilisation d'un dispositif d'osmose inverse seulement peut aussi s'avérer efficace. Le choix des équipements et des procédures doit se faire selon la concentration de cyanobactéries et cyanotoxines présentes dans le puits. Il est donc important pour un propriétaire de puits de pouvoir effectuer des analyses sur l'eau avant et après le traitement pour ajuster les paramètres. De plus, des analyses régulières doivent être faites, car ces concentrations sont variables en fonction des saisons [68, 69]. La variation peut être causée par plusieurs facteurs comme la température, les précipitations, les activités agricoles, etc.

1.7. Méthodes d'analyses disponibles

Tel que mentionné dans les sections précédentes, l'importance de procéder à la quantification des cyanotoxines touche autant les usines de traitement des eaux, les installations individuelles des particuliers, les installations municipales et les installations récréatives. Pour répondre à ces besoins, il existe des méthodes d'analyses pouvant être réalisées dans les usines de traitement, effectuées par des laboratoires accrédités ou réalisées par des particuliers. Le tableau 2 présente les principales méthodes d'analyses disponibles. Pour toutes les méthodes d'analyses des toxines, la lyse des cellules doit être effectuée au préalable, afin d'obtenir une mesure des toxines extracellulaires et intracellulaires, pour ainsi pouvoir comparer les résultats obtenus à la réglementation en vigueur. Ces méthodes sont fastidieuses, doivent être réalisées par du personnel qualifié et

nécessitent l'achat d'ensembles commerciaux dispendieux. De plus, les ensembles commerciaux utilisant des tubes nécessitent l'équipement pour l'incubation à 37°C ainsi qu'un spectrophotomètre pour obtenir une mesure de la coloration plus précise.

Tableau 2. Exemples d'analyses accessibles des cyanobactéries ou cyanotoxines

	Fournisseurs	Méthode	Analytes	Coût par échantillon (investissement initial)	Délais	LD, domaine de concentration et restrictions	
Usines de traitements	N.D.	Sonde	Cyanobactérie	N.D. (14000-30000 \$CAD)	N.D.	N.D.	[21]
	Plusieurs	ELISA	MC (totales)	50-100 \$CAD (1000-10000\$CAD)		Surestimation Eau non-chlorée	[21]
Laboratoires	CEAEQ	Microscopie	Cyanobactérie	85 \$CAD (dépistage) 280 \$ (identification)	48-96 h.	LD : variable	[21, 70]
		LC-MS/MS	MC-LR MC-LA MC-RR MC-YR Anatoxine a	380 \$CAD	48-72 h.	0,005 µg/L	[21, 71]
		LC-MS/MS	Saxitoxine Néo-saxitoxine Cylindrospermopsine	380 \$CAD	48-72 h.	N.D.	[21]
Ensembles commerciaux	Abraxis LLC	Bandelettes ELISA	MCs + Nodularines	30 \$US	35 min.	LD : 1 µg/L 1-5 µg/L	[72, 73]
		Tubes ELISA	MCs + Nodularines	N.D.	40 min.	0,15-5 µg/L	[74]
	Envirologix	QualiTube™ ELISA	MCs + Nodularines	20-40 \$US	45 min.	LD : 0,3 µg/L 0,5-3 µg/L	[73, 75]
	Beacon Analytical Systems Inc.	Tubes ELISA	MCs + Nodularines	10-20 \$US	40 min.	0,3-5 µg/L	[76]
	ZEULAB LC	Tubes MicroCystest Inhibition PP2A	MCs + Nodularines	N.D.	30 min.	0,5-2,5 µg/L	[77]

CEAEQ : Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec. Seul laboratoire accrédité au Québec en 2009.

LC-MS/MS : Chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem

ELISA: *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

MCs: Microcystines

LD: Limite de détection

N.D. : Information non disponible

1.8. Méthodes d'analyses en développement

Les méthodes actuellement accessibles commercialement pour les analyses portatives à petits et moyens budgets ne permettent pas d'obtenir des résultats fiables, spécifiques et à moindre coût. Les bandelettes et les tubes comme ceux d'Envirologix peuvent donner des résultats faussement positifs jusqu'à un taux de 80% [78]. Les analyses effectuées par le CEAEQ sont dispendieuses et l'obtention des résultats peut être longue. De plus, les analyses effectuées par la méthode de chromatographie liquide haute performance peuvent parfois sous-estimer la concentration réelle des toxines dans les échantillons [79]. Des recherches sont effectuées en grand nombre afin de trouver des méthodes plus spécifiques, précises et possédant de plus basses limites de détection [80-86]. Ces recherches portent sur l'utilisation de nanoparticules [87-92], de points quantiques [13, 93-95], de combinaisons de protéines et d'enzymes [96, 97] ou utilisent des techniques comme la résonance de plasmons [98, 99], un guide d'onde optique [100] ou le magnétisme [101]. Par contre, ces recherches s'effectuent pour une utilisation avec des équipements de laboratoire, comme des plaques à puits ou des systèmes complexes d'électrodes. Seules quelques nouvelles méthodes comme celles décrites dans les prochains paragraphes commencent à être intégrées à des dispositifs d'analyses portables.

Wang *et al* [3] ont utilisé des électrodes faites d'un papier recouvert de nanotubes de carbone. Pour effectuer une détection immunologique des microcystines, des anticorps spécifiques à la MC-LR ont été ajoutés à la solution de nanotubes de carbone servant à recouvrir les électrodes de papier. Les mesures se font directement dans les solutions contenant les toxines. Pour l'analyse, une station électrochimique, une électrode de référence et une contre-électrode sont nécessaires. La valeur de courant est mesurée pour chaque échantillon. Le courant diminue en fonction de la concentration en MC-LR dans l'échantillon. La limite de détection obtenue par cette technique est de 0,6 µg/L, ce qui n'est pas plus bas que les ensembles commerciaux pour une technique nécessitant du matériel difficilement transportable.

Toujours dans le domaine électrochimique, Zhang *et al* [4] ont conçu une électrode d'or poreuse à double face afin de détecter la MC-LR. Pour effectuer l'analyse, il faut un potentiostat, un système d'affichage et le support contenant l'électrode qu'ils ont fabriquée. La double électrode d'or est faite à partir d'une membrane poreuse de nylon sur laquelle a été déposée une fine couche d'or de chaque côté. Elle est insérée au centre d'un support.

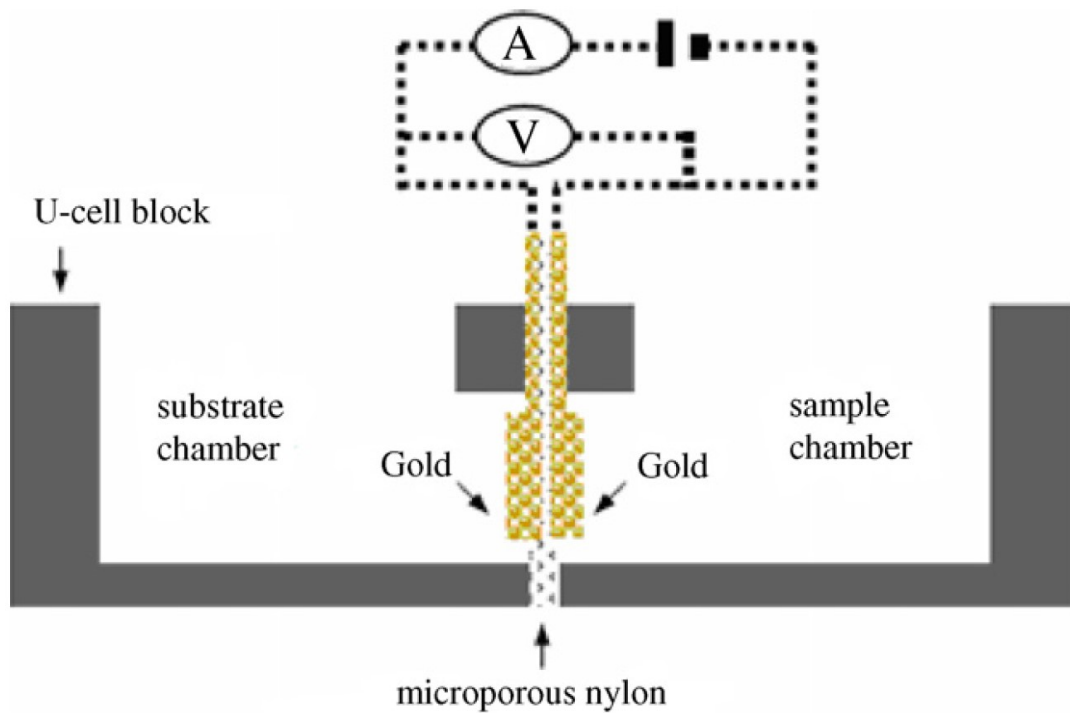


Figure 3. Cellule de diffusion de type U contenant la double électrode d'or poreuse. [4]

L'électrode sépare donc le support en deux parties afin d'obtenir deux cavités de part et d'autre. Une des deux surfaces d'or est fonctionnalisée avec un anticorps spécifique de la MC-LR par adsorption physique afin de former l'électrode de travail. La surface d'or non fonctionnalisée de l'autre côté de la membrane joue le rôle de la contre-électrode. Dans la cavité où l'électrode de travail est fonctionnalisée, un disque poreux contenant un complexe de la toxine liée à l'enzyme glucose oxydase (MC-LR/GOx) est inséré. Du côté de la contre-électrode, un disque poreux non traité est inséré. Ces éléments constituent le support d'électrode qui est relié au potentiostat. Pour l'analyse, l'échantillon contenant la

toxine est ajouté dans la cavité du support où se trouve le disque traité et la surface fonctionnalisée de l'électrode. Il se produit donc une compétition entre la toxine de l'échantillon et le complexe MC-LR/GOx sur les anticorps immobilisés de l'électrode. Une solution contenant du glucose est ajoutée dans la cavité de la contre-électrode. Le glucose migre à travers le support, à travers la membrane, pour être oxydé par le complexe MC-LR/GOx. Le système mesure alors l'échange d'électrons sur les complexes d'enzymes qui ont réussi à se lier aux anticorps de l'électrode. Le groupe obtient une limite de détection comparable à 0,1 µg/L. La fabrication de la double électrode d'or sur la membrane de nylon est une méthode complexe nécessitant des équipements spécifiques. De plus, l'adsorption physique de l'anticorps sur l'électrode d'or offre une méthode d'immobilisation peu robuste. Cette méthode n'est pas complètement portable, mais elle offre une bonne opportunité pour le devenir.

Morais *et al* [5] ont utilisé la technologie des disques compacts pour analyser les microcystines. Les disques doivent être préparés en déposant les réactifs à l'aide de pochoirs adaptés pour créer 48 régions de détection en surface. Une région de détection est composée de quatre zones. Sur une des zones qui sert à la détection est déposée une solution contenant des MC-LR qui seront fixées sur le disque en quantité précise. Une autre zone sert de témoin négatif contenant de la biotine et les deux autres sont des témoins positifs pour les anticorps marqués utilisés. La prise de mesure sur une des 48 régions commence par l'incubation de l'échantillon contenant des toxines avec une quantité précise d'anticorps. Il se produit alors une compétition pour les anticorps entre les toxines de l'échantillon et celles fixées sur le disque. Plus il y a de toxines dans l'échantillon, moins il restera d'anticorps libres qui seront liés sur le disque. Après un rinçage, un mélange d'anticorps secondaires possédant des nanoparticules d'or est ajouté. Ceux-ci pourront seulement se lier aux endroits où un anticorps de la MC-LR est déjà lié sur le disque. Une solution à base d'argent est utilisée pour amplifier le signal avant d'utiliser le lecteur de disque. La préparation du disque prend plus de 16 heures et les réactions immunologiques totalisent 37 minutes. Un lecteur et un logiciel sont requis pour compléter l'analyse. Cette

technique qui est considérée comme portable permet d'obtenir un domaine de quantification linéaire de 0,12 à 2 $\mu\text{g/L}$.

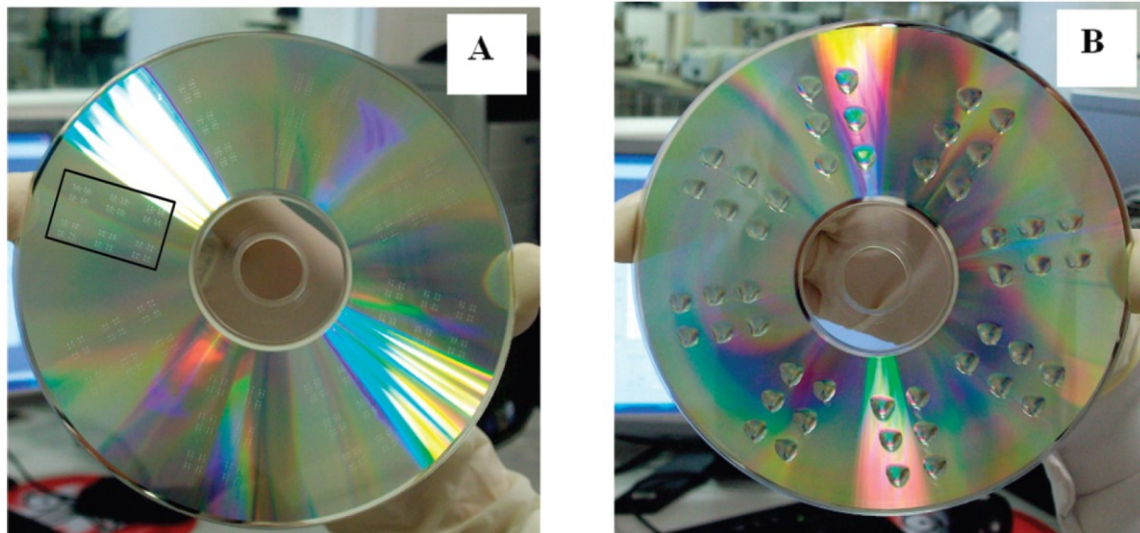


Figure 4. A : Disque compact montrant les 8 sections, dont une encadrée. Elles possèdent 6 régions de 4 zones de détections chacune. B : Disque compact après 8 minutes en position verticale sur lequel a été ajouté 10 μL de solution à chaque région. [5]

Long *et al* [6] ont publié en 2009 les recherches sur l'adaptation d'un système commercialisé en Chine servant initialement à l'analyse des polluants organiques. Toutes les composantes servant à l'analyse sont contenues dans une mallette portable; le système de pompe péristaltique, la cellule fluidique en verre, le système optique ainsi que l'ordinateur intégré. L'analyse se fait avec un laser qui est relié d'abord à un adaptateur optique et ensuite à la fibre optique qui est dans la cellule d'analyse. La surface de la fibre optique est convertie en biocapteur par une modification de sa surface avec la toxine liée de manière covalente. Lors de la mesure, l'échantillon est préalablement mélangé avec une quantité précise d'un anticorps spécifique possédant un marqueur fluorescent. Après deux minutes, selon la quantité de toxine, il restera plus ou moins d'anticorps libres. Le mélange est alors acheminé dans la cellule en verre par le système de pompes. Les anticorps marqués libres formeront des complexes avec les toxines sur la fibre optique. Pour l'analyse, l'illumination créée par le laser à travers la fibre optique excitera les complexes

fluorescents sur la fibre. L'émission de fluorescence produite par les anticorps marqués est captée par l'adaptateur et le signal passe à travers un filtre avant d'être acheminé à la photodiode.

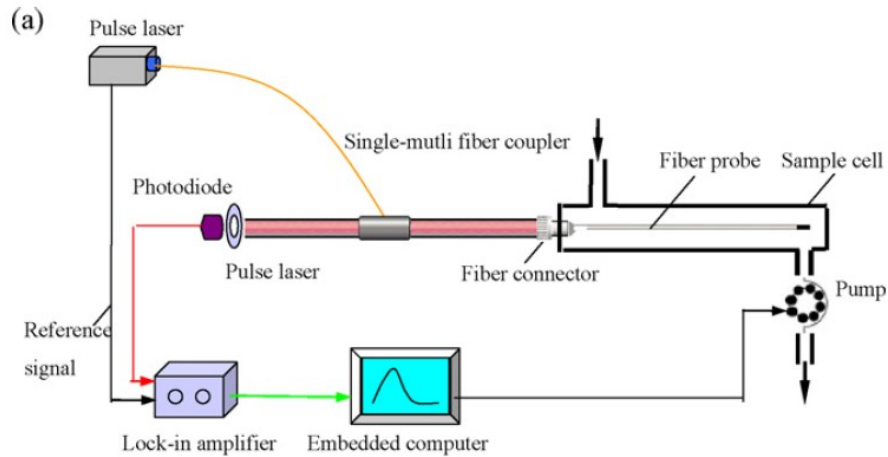


Figure 5. Analyse portable de trace de contaminants organiques. a) Schéma des composantes. b) Système portable. [6]

Le groupe a obtenu une limite de détection de la MC-LR de $0,03 \mu\text{g/L}$ et un domaine de quantification variant de $0,1$ à $10,1 \mu\text{g/L}$. La fibre optique peut être ensuite régénérée pour une autre mesure. Ces étapes se font en 20 minutes approximativement, ce qui représente une bonne performance pour un système immunologique, mais celui-ci reste coûteux et peu accessible.

Herranz *et al* [7] ont publié en 2012 le développement d'une méthode immunologique pour détecter la MC-LR en utilisant la technique du guide d'onde planaire en adaptant le prototype *Naval Research Laboratory (NRL) Array Biosensor* qui est aussi contenu dans une mallette portable. Cet appareil inclut un laser, un système de pompage, un double module microfluidique à six réservoirs fabriqué à partir d'un photopolymère, une plaque de microscope fonctionnalisée comme biocapteur et une caméra comme détecteur à transfert de charge (CCD) pour la fluorescence. La plaque de microscope est préparée à l'aide d'un pochoir conçu pour correspondre aux différents réservoirs du module microfluidique. La toxine à détecter, la MC-LR, est fixée de manière covalente à la surface de la plaque. Le principe de l'analyse repose encore une fois sur la détection compétitive entre les toxines de l'échantillon et les toxines fixées sur le biocapteur avec l'anticorps de la MC-LR. Pour ce faire, l'échantillon contenant des toxines est mélangé au préalable avec une quantité précise d'anticorps. Ce mélange est par la suite acheminé dans le module microfluidique. Les anticorps libres restant dans le mélange seront fixés sur la surface du biocapteur. Après un lavage, un anticorps secondaire possédant une molécule fluorescente est ajouté. Ce dernier se fixera à la surface seulement aux endroits où un premier anticorps était déjà présent. La détection de fluorescence se fait avec le laser. Pour cet appareil, une limite de détection de 0,016 µg/L et un domaine quantitatif de 0,06 à 1,5 µg/L sont obtenus. Une mesure, incluant les étapes de régénération du biocapteur, dure en moyenne 60 minutes. Par contre, la complexité de la fabrication du module fluidique et du masque pour la fonctionnalisation sont des limites dans le développement. De plus, la capacité maximale de quantification n'est pas adaptée à l'utilisation de l'appareil quand les toxines sont présentes en forte concentration.

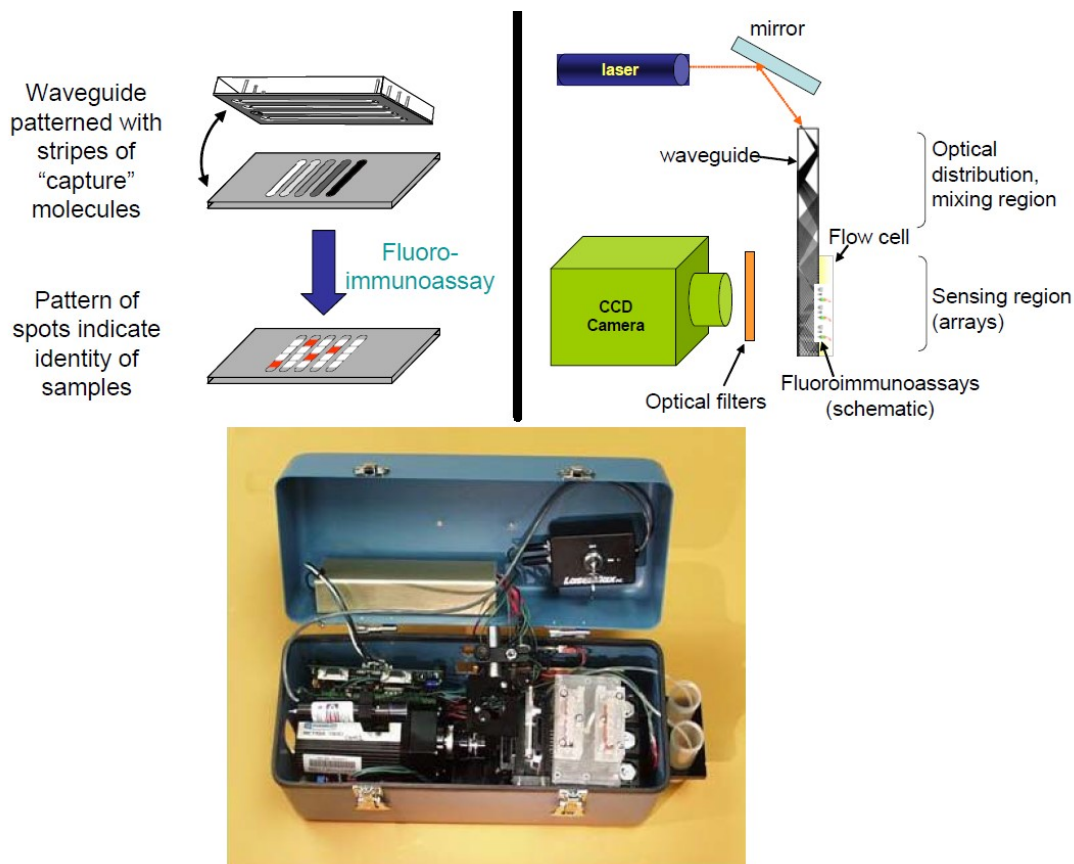


Figure 6. Prototype NRL ; guide d'onde, mécanisme optique et système de transport. [102]

Un an plus tard, Shi *et al* [69] ont rapporté l'essai en continu de leur instrument d'analyse de la MC-LR basé sur le même principe que le groupe précédent. Celui-ci a été mis en fonction dans une installation près d'un site de prise d'eau potable en Chine. Le principe de l'analyse repose aussi sur la détection compétitive entre les toxines de l'échantillon et les toxines fixées sur le biocapteur, mais cette fois-ci directement avec un anticorps marqué d'un agent fluorescent. L'appareil se compose de plusieurs modules différents. Le module de pompage tempéré est muni d'une valve d'injection à 6 sorties intégrant une boucle qui permet l'incubation des réactifs avant l'analyse. Le module d'analyse fonctionne sur le principe d'émission de fluorescence. Il inclut un laser pulsé pour l'excitation, un système

fluidique où le biocapteur peut être inséré, des fibres optiques, un filtre optique et une photodiode pour la détection de l'émission.

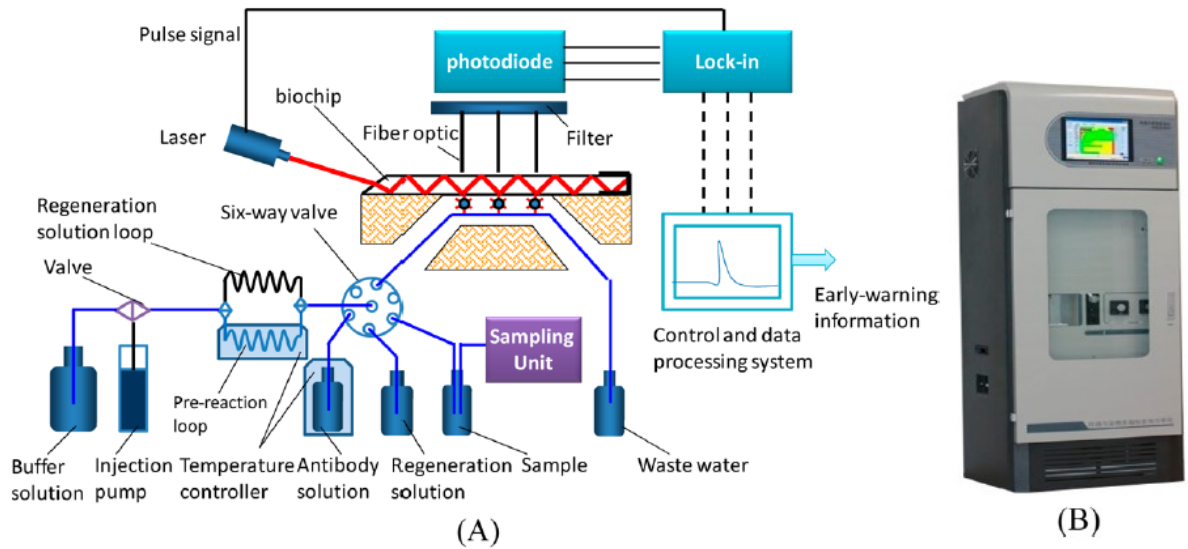


Figure 7. (A) Schéma du principe de fonctionnement. (B) Photo de l'appareil. [69]

Le biocapteur constitue une pièce amovible réutilisable dans le module d'analyse. Le biocapteur est fabriqué à partir d'une plaque de verre dont l'une des extrémités est polie à un angle de 45° afin de permettre au rayonnement laser d'entrer à l'intérieur de la plaque et de subir des réflexions totales internes précises. La surface de la plaque de verre qui sera en contact avec l'échantillon est traitée préalablement afin de fixer les toxines en surface de manière covalente et contrôlée. Un autre module de l'instrument contient les contrôles électroniques, l'ordinateur et le système d'affichage. Cet instrument n'est pas portable pour effectuer des analyses sporadiques sur le terrain. Une mesure complète prend environ 30 minutes, ce qui inclut l'incubation des réactifs, le temps de résidence au biocapteur, l'analyse de l'émission de fluorescence et temps de régénération du biocapteur pour la mesure suivante. Le groupe a obtenu une limite de détection de la MC-LR de 0,09 µg/L et un domaine de quantification variant de 0,2 à 4 µg/L.

Feng *et al* [13] ont utilisé une plateforme optofluidique portable pour détecter la MC-LR. Le dispositif contient un laser, un adaptateur optique pour diriger l'illumination du laser et pour capter la fluorescence produite, un filtre, une photodiode, une cellule fluidique et un ordinateur. Pour effectuer la mesure, l'échantillon contenant la toxine est mélangé avec des particules de points quantiques contenant la MC-LR en surface ainsi qu'avec des anticorps marqués d'un fluorophore. Il y a une compétition entre les toxines de l'échantillon et les points quantiques pour la liaison avec les anticorps. Le mélange est ensuite introduit dans la cellule pour effectuer la détection optique. L'illumination du laser se transfère aux points quantiques, ce qui va permettre l'excitation des fluorophores liés aux points quantiques seulement. L'émission produite par les fluorophores est ensuite mesurée. L'expérience permet d'obtenir une limite de détection de 0,03 µg/L dans un domaine linéaire variant de 0,1 à 4,0 µg/L. Les points quantiques ne sont pas réutilisables ce qui est un désavantage de cette technique.

Lindner *et al* [8] ont utilisé un système de capillaire fonctionnant avec le principe de chimiluminescence afin de détecter la MC-LR. Le système pesant environ 11 kg peut être portable et se compose d'un système fluidique automatique, une zone pouvant contenir trois capillaires et un photodétecteur. L'appareil est complètement automatisé par une programmation, un ordinateur est donc requis avec l'appareil. Les capillaires peuvent être utilisés pour permettre trois analyses simultanées. L'intérieur de ceux-ci contient déjà un composé de MC-LR/biotine fixé par une liaison spécifique non covalente avec des streptavidines fixés sur la paroi interne du capillaire. Pour effectuer la mesure, le système fluidique mélange l'échantillon contenant la toxine avec la solution d'anticorps. Ce mélange est ensuite acheminé à l'intérieur des capillaires. Les anticorps qui ne sont pas déjà liés aux MC-LR de l'échantillon peuvent se lier aux composés MC-LR/biotine du capillaire pour former des complexes. Le système injecte ensuite une solution contenant un anticorps secondaire ayant une affinité pour l'anticorps de la MC-LR. Cet anticorps secondaire possède une enzyme peroxydase de raifort (HRP). Finalement, une solution de chimiluminescence contenant du luminol et du peroxyde d'hydrogène est injectée dans le capillaire. L'émission produite est captée par le photodétecteur.

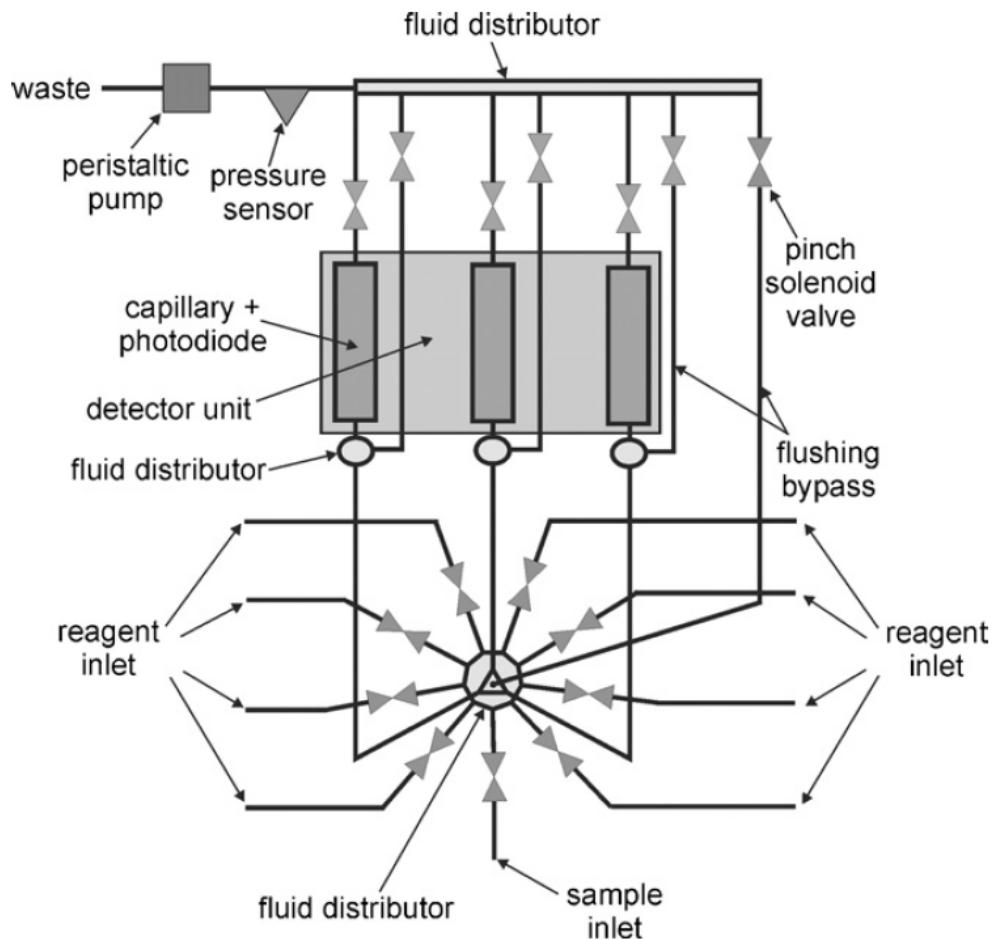


Figure 8. Représentation du système fluïdique. [8]

Une mesure complète dure environ 45 minutes. La limite de détection de cette méthode est de 0,2 µg/L pour les échantillons préparés dans un tampon. Le domaine de quantification n'est pas précisé dans la publication. De plus, la réutilisation des capillaires n'est pas possible, car la toxine est fixée à l'intérieur de ceux-ci de manière non covalente.

Xiang *et al* [9] ont mis au point une analyse plus spécifique de la MC-LR par une détection en chimiluminescence utilisant la combinaison d'un aptamère et d'un anticorps. Cette combinaison permet d'éliminer les interactions des autres microcystines qui ont habituellement lieu lorsqu'on utilise seulement des anticorps. Pour cette technique, des

capillaires en verre fonctionnalisés ainsi qu'un détecteur portatif pour chimiluminescence BioLay sont nécessaires. La fonctionnalisation du capteur consiste à immobiliser de façon covalente un aptamère synthétisé pour la MC-LR à la surface interne des capillaires. Le capillaire est combiné à une poire pour aspirer et vider les solutions. L'anticorps utilisé est déjà combiné à un enzyme peroxydase de raifort (HRP). Pour effectuer la détection, l'échantillon possédant des toxines ainsi que des anticorps HRP est aspiré dans le capillaire. Les trois composés forment alors un complexe aptamère/MC-LR/anticorps-HRP en fonction de la quantité de toxine dans l'échantillon. Une solution de luminol et de peroxyde d'hydrogène est ensuite ajoutée. La mesure de l'émission se fait directement à l'aide d'un petit appareil portable pesant seulement 0,3 Kg et conçu pour les capillaires. La limite de détection pour cette technique est de 0,3 µg/L avec un domaine linéaire de 0,5 à 4 µg/L. Le temps requis pour une mesure est de 30 minutes approximativement.

Liu *et al* [10] ont mis au point un test colorimétrique semi-quantitatif pouvant être effectué sur des bandes absorbantes. Le composé permettant le changement de couleur est une nanoparticule d'or ayant une couleur rouge pâle visible à l'œil nu. Ces nanoparticules sont fonctionnalisées avec des anticorps de la MC-LR. La bande de test est une membrane de nitrocellulose qui se compose d'une partie poreuse pour déposer l'échantillon au bas, suivi d'une zone de détection au milieu de la bande et une zone de contrôle dans le haut. La zone de détection contient un composé de MC-LR fixé et la zone de contrôle contient un anticorps secondaire de celui sur la nanoparticule. Pour effectuer une mesure, l'échantillon contenant la toxine est mélangé avec les nanoparticules d'or fonctionnalisées. Cette étape permet de lier les toxines présentes aux nanoparticules d'or pour former des complexes. Plus il y a de toxines, moins il y aura de nanoparticules libres. Ensuite, le mélange est déposé sur la zone poreuse de la bande. Les composés vont migrer vers la zone de détection. Dans cette zone, seulement les nanoparticules d'or libres vont être retenues par les MC-LR fixé sur la bande. Toutes les autres nanoparticules seront retenues dans la zone de contrôle suivante. Selon la quantité de nanoparticules dans la zone de détection, une différente coloration rouge pourra être observée. Une coloration plus pâle indique une faible présence de nanoparticules dans la zone signifiant une plus grande concentration en toxine dans

l'échantillon. Un échantillon possédant une concentration en MC-LR de 1 $\mu\text{g/L}$ donne une absence de couleur dans la zone de détection. Il n'est donc pas possible de détecter des concentrations supérieures. De plus, il n'est pas possible de distinguer la variation de couleur pour les échantillons de concentration inférieure à 0,2 $\mu\text{g/L}$.

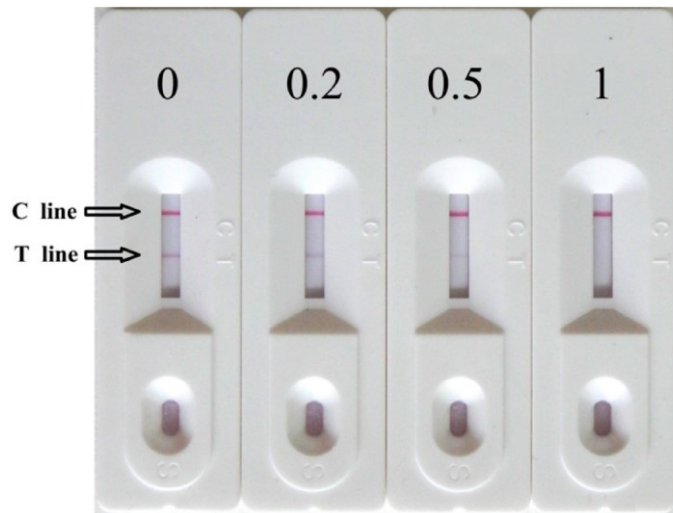


Figure 9. Exemple de résultats obtenus pour la détection de MC-LR de différentes concentrations (C : contrôle, T : Test). [10]

Sun *et al* [11] utilisent le même principe de bande absorbante que le groupe précédent. À la place des nanoparticules, ce sont des points quantiques de cadmium-sélénium (Cd-Se) qui sont fonctionnalisés avec les anticorps. Cette différence nécessite une détection à l'aide d'un spectrophotomètre et d'un ordinateur. Ceci a pour avantage de produire des résultats quantitatifs. Les analyses pour la MC-LR donnent une limite de détection de 0,1 $\mu\text{g/L}$ avec un domaine linéaire pour des concentrations variant de 0,25 à 5 $\mu\text{g/L}$. Une autre différence avec le précédent groupe se situe au niveau de la zone de contrôle. Un anticorps primaire de la MC-LR est utilisé au lieu d'un anticorps secondaire. Cela n'affecte pas la mesure des échantillons.

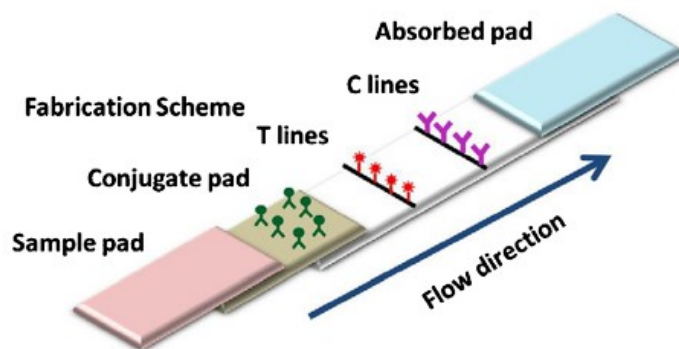


Figure 10. Schéma de la bande absorbante de détection. [11]

Queiros *et al* [12] se sont basé sur l'utilisation d'un polymère à empreinte moléculaire pour faire une détection potentiométrique. La méthode consiste à utiliser un pH-mètre muni d'une électrode de travail recouverte de l'empreinte de copolymère de (3-aminopropyl)triéthoxysilane / diphényldiméthoxysilane / tétraéthoxysilane (APTES/DPDMS/TEOS). Pour la fabrication de ce polymère, la MC-LR est mélangée avec les monomères avant d'effectuer la polymérisation. Le polymère résultant est ensuite lavé afin d'éliminer la MC-LR ce qui crée des cavités idéales à la forme de la toxine. Ce polymère est ensuite appliqué sur l'électrode de travail. Le potentiel est alors mesuré pour des échantillons contenant des toxines. Plus il y aura de MC-LR logées dans les cavités du polymère, plus le potentiel résultant sera élevé. Le groupe a obtenu une limite de détection de 0,75 $\mu\text{g/L}$ et un domaine de réponse linéaire de 0,77 à 2,00 $\mu\text{g/L}$. Cette méthode est portable, car peu d'équipements sont nécessaires pour effectuer l'analyse et le pH-mètre lui-même est portable. Par contre, la préparation reproductible est complexe et le domaine de quantification est peu étendu.

Ces dispositifs offrent des voies de recherches prometteuses. Toutefois, ils ont aussi chacun leurs inconvénients. Les composantes fluidiques de ceux-ci sont majoritairement fabriquées en verre ou en photopolymère à partir de procédés complexes comme la photolithographie. La modification, l'adaptation ou l'optimisation de ces appareils peuvent

représenter des barrières dans le développement. De ce fait, la fabrication de nouveaux dispositifs par impression tridimensionnelle s'avère être une alternative adéquate, de par les avantages qui seront présentés à la section 2.5.1.

Un dispositif fluide sera donc fabriqué par impression tridimensionnelle de thermoplastique. Celui-ci sera ensuite adapté en biocapteur par une fonctionnalisation des produits biologiques sélectionnés. Ce dispositif sera conçu dans la perspective de réaliser la détection de cyanotoxines, en particulier de la microcystine-LR, car elle est réglementée par plusieurs instances et elle est majoritairement présente dans les eaux contaminées par les cyanobactéries. La détection de cette toxine permettra donc d'évaluer le potentiel toxique de l'eau analysée. L'utilisateur sera ainsi en mesure de faire un meilleur suivi de la qualité de l'eau, un traitement adéquat et il pourra effectuer une demande d'analyse plus approfondie si la présence de MC-LR se révèle.

Chapitre 2 :

THÉORIE

2.1. Biocapteurs

Un biocapteur est un outil analytique qui possède la capacité de transformer une information biochimique en un signal utilisable [103]. Un tel dispositif doit inclure plusieurs composantes et intégrer les interactions entre chacune d'elles. Les produits et composantes permettant une mesure se décrivent comme suit : l'analyte (a), le biorécepteur (c), le transducteur (e) et l'indicateur (g). Entre chacune de ces parties, il doit y avoir une interaction déterminée : entre le couple analyte-biorécepteur (b), le signal produit par le couple analyte-biorécepteur capté par le transducteur (d) ainsi que le signal électrique du transducteur jusqu'à l'indicateur (f). Tout dépendamment des utilisations, les biocapteurs sont parfois classés selon le biorécepteur ou selon le transducteur.

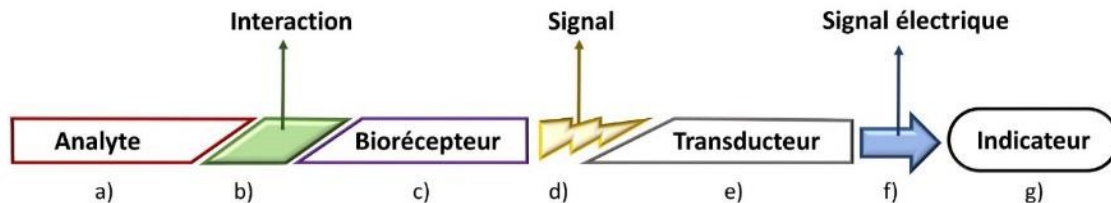


Figure 11. Représentation des parties d'un biocapteur

- a) L'analyte peut prendre plusieurs formes. Il peut être organique ou inorganique. Pour qu'un analyte soit détectable en utilisant un biocapteur, il doit induire une réponse ou une modification d'un signal avec un biorécepteur décrit au point c). L'analyte peut donc être un élément

chimique, un ion, une molécule organique, une protéine, un anticorps, une cellule, etc.

- b) L'interaction entre l'analyte et le biorécepteur doit être spécifique. Elle doit durer un temps requis pour que l'analyse puisse avoir lieu. Elle peut être réversible ou non réversible. L'interaction doit se produire avec une probabilité élevée pour assurer la production d'un bon signal.
- c) Le biorécepteur doit être sélectionné en fonction de l'analyte à détecter, de même qu'en fonction du signal à produire. Il peut prendre la forme d'une enzyme, d'un anticorps, d'un antigène, une protéine, de l'ADN, de l'ARN, d'un système cellulaire, d'une bactérie, d'un tissu, d'une microalgue, d'un polymère biomimétique, etc. Selon la méthodologie d'analyse recherchée, le biorécepteur peut être libre dans le dispositif de détection ou fixé sur celui-ci.
- d) Le signal provenant de l'interaction du couple analyte-biorécepteur peut être la création ou l'apport d'une espèce optiquement détectable, la variation du pH, la variation de la température, la variation de la masse, le changement d'enthalpie, etc.
- e) Le transducteur est choisi en fonction du signal produit. Il doit transformer ce dernier en signal électrique. Il peut prendre la forme d'une électrode, d'un pH-mètre, d'un compteur de photon, d'un dispositif piézoélectrique, d'un thermistor, etc.
- f) Le signal électrique doit être acheminé jusqu'à l'indicateur de façon à ne pas perdre d'information. Cette étape peut aussi être couplée à un système d'amplification, de conversion, de linéarisation ou de compression du signal.
- g) L'indicateur est majoritairement un ordinateur possédant le logiciel adéquat au transducteur et au signal qu'il envoie. Dans de plus simples cas, l'indicateur peut être seulement un enregistreur.

Un système de biocapteur peut être complexifié au besoin en ajoutant, par exemple, des filtres optiques avant un détecteur à photodiode [69]. Il est aussi possible d'ajouter d'autres molécules biologiques accompagnées de leur substrat afin d'amplifier le signal produit par le couple analyte-biorécepteur étudié [81].

2.1.1. Anticorps et antigènes

Les biorécepteurs pour le type de biocapteur utilisé dans le projet en vue d'effectuer la détection de la microcystine-LR sont des anticorps spécifiques. Dans ce cas, il s'agit donc d'une détection immunologique et la MC-LR joue le rôle d'un antigène. La microcystine-LR possède l'épitope reconnu par l'anticorps. La figure 12 est une représentation des différentes parties d'un anticorps.

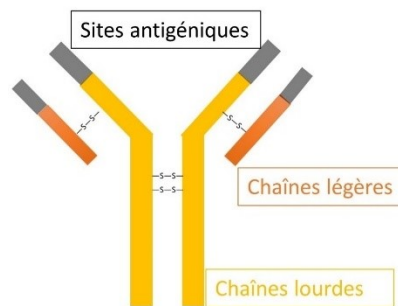


Figure 12. Schéma simplifié d'un anticorps

Les enzymes PP1 et PP2A auraient pu être des bons choix de biorécepteurs, car la MC-LR possède un site de liaison spécifique qui modifie l'activité de ces enzymes tel qu'expliqué à la section 1.5.1. Il existe quelques méthodes de détection enzymatique [15-17], mais celles-ci ont montré des inconvénients. Des molécules possiblement présentes dans les eaux peuvent occasionner des interférences avec ces enzymes, comme l'acide okadaïque [52] et la calyculine A [56]. De plus, des contradictions se retrouvent dans la littérature au

sujet de l'immobilisation de l'enzyme. Dans un cas, une fixation permanente de l'enzyme sur un biocapteur pourrait causer la diminution de la sensibilité [104], tandis que dans l'autre cas, l'activité enzymatique n'est pas bien conservée en solution et les méthodes de conservation sont complexes [105].

Immunologie pour MC-LR

Pour la détection de la microcystine-LR, les anticorps ont donc plus de spécificité que les enzymes. Au niveau de l'immobilisation, il se peut également que la réponse d'un anticorps soit diminuée si la fixation se fait au mauvais endroit sur la protéine. Par contre, dans le cas des anticorps, la littérature [106] rapporte des techniques afin de limiter la liaison près du site de reconnaissance et de favoriser la fixation par le site désiré sur l'anticorps.

L'anticorps pouvant être utilisé comme biorécepteur pour ce projet est un anticorps monoclonal de la microcystine-LR ayant comme numéro de clone MC10E7. Il est spécifique aux microcystines possédant une arginine à la position 4 du macrocycle. La liaison de l'anticorps se fait avec l'épitope, la partie N-méthyl-dehydroalanine des microcystines (numéroté 7 de la figure 1). La limite de détection minimale précisée par le fournisseur (*Enzo Life Sciences, Inc.*) pour cet anticorps est de 0,006 µg/L. La concentration inhibitrice médiane (CI50) est de 0,06 µg/L. La constante d'affinité entre les microcystines qu'il est possible de lier et l'anticorps est de 7×10^{10} L/mol [107]. Une constante d'affinité supérieure à 1×10^{10} L/mol est considérée comme une liaison forte, se rapprochant d'une liaison irréversible [108, 109].

Le complexe stable formé par le couple anticorps-antigène, dans ce cas, ne produit pas de signal pouvant être observé par un transducteur. Dans l'objectif d'utiliser un transducteur optique, l'ajout d'une composante optiquement active est possible. Pour ce projet, un fluorophore bien connu dans la détection biochimique est sélectionné, soit l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Ce composé absorbe les longueurs d'onde de 492 à 495 nm et

produit une émission de longueurs d'onde de 520 à 535 nm [20, 110]. Pour ajouter ce fluorophore dans l'étape de reconnaissance biochimique, celui-ci peut être préalablement fixé sur une amine libre d'un anticorps choisi par la fonction isothiocyanate (figure 13) [111]. L'anticorps étiqueté possédant le fluorophore peut être directement celui qui réagit avec la toxine ou être sur un anticorps secondaire qui se fixera avec le premier anticorps.

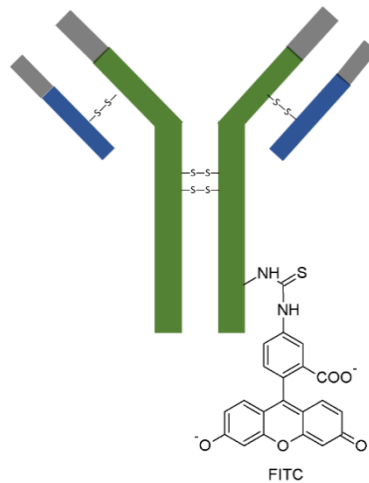


Figure 13. Schéma d'un anticorps étiqueté avec l'isothiocyanate de fluorescéine.

Pour la détection de la microcystine-LR à l'aide de l'anticorps sélectionné MC10E7, la mobilité des composés peut se définir de trois principales façons :

- L'anticorps et l'antigène peuvent être libres dans la solution à l'intérieur du biocapteur. De cette manière, les substances fluorescentes ne doivent pas être en excès.
- Un premier anticorps peut être fixé à la paroi du support du biocapteur par une fonctionnalisation prédéterminée. La MC-LR ajoutée par la suite peut alors se lier à l'anticorps par son épitope. Afin de créer un signal pouvant être détecté, un autre anticorps de la MC-LR est ajouté, mais ce dernier étant étiqueté avec le fluorophore. Le fonctionnement de cette séquence de détection dépend du mode d'action des deux anticorps sur l'épitope de la MC-LR. La détection

pourra être efficace si deux anticorps peuvent se partager le même épitope. Par contre, si un seul anticorps peut utiliser l'épitope comme site de liaison, la détection ne donnera pas un résultat en fonction de la concentration de l'analyte. Dans un autre cas où il se produit un partage entre le premier anticorps et celui étiqueté d'un fluorophore, la méthode de détection et les calculs découlant devront être ajustés.

- Une autre séquence de détection envisageable débute par la fonctionnalisation des microcystine-LR elles-mêmes à la paroi du support du biocapteur. Il s'en suivra l'ajout d'un anticorps étiqueté d'un fluorophore pour permettre la détection du complexe stable antigène-anticorps formé. Cette séquence est possible seulement si la microcystine-LR est immobilisée à la paroi par un site différent de l'épitope étant la partie N-méthyl-dehydroalanine. À l'opposé de cette partie se trouve l'acide aminé arginine possédant un NH_2 disponible, le seul de la MC-LR. Ce groupement pourrait servir à fixer la molécule à une surface, tout en laissant l'épitope libre.

2.1.2. Transducteur

La fluorescence produite par la molécule FITC nécessite un mode de détection optique. Le transducteur permettant l'analyse du signal doit être muni d'une composante d'émission de lumière aux longueurs d'onde d'absorption du fluorophore. Une autre composante doit capter la lumière émise par le fluorophore.

2.2. Fonctionnalisation

La fonctionnalisation dans ce projet se décrit par la création d'une liaison covalente entre la paroi interne du canal du biocapteur et la molécule à immobiliser pour la séquence de

détection choisie. Le développement d'un processus d'immobilisation covalente pourrait mener à la réutilisation du biocapteur. De plus ce type de liaison augmente la stabilité de la surface en fonction du temps [69].

Les molécules à immobiliser, que ce soit les anticorps ou la toxine, contiennent entre une et plusieurs terminaisons amines (NH_2). Les amines peuvent former des liaisons amides avec des acides carboxyliques (COOH) en présence de certains réactifs [18, 112-114]. La paroi du biocapteur développé devra donc contenir des groupements COOH en surface pour permettre ces liaisons amides.

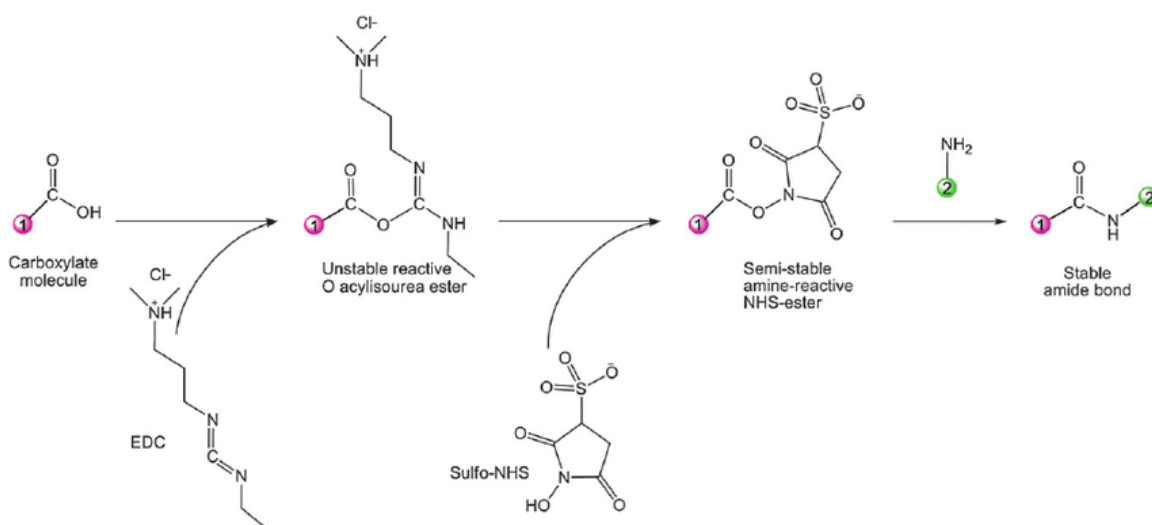


Figure 14. La chimie de EDC-NHS [115]

La création d'un lien amide entre une amine et un acide carboxylique peut se produire par l'entremise de quelques étapes de réaction décrites comme suit [112, 113] :

- L'ajout des réactifs 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide / N-hydroxysuccinimide (EDC/NHS) sur la surface contenant des acides carboxyliques. Le EDC va d'abord réagir avec le groupement COOH afin de former un intermédiaire de réaction instable. Le NHS remplacera ensuite le

EDC pour former un intermédiaire de réaction stable. Cette étape se nomme l'activation de la surface.

- b) Le composé contenant la fonction NH_2 est ajouté sur la surface activée. Il s'en suivra la formation du lien amide entre la surface et le composé ajouté.

2.3. Hydrolyse des esters

L'hydrolyse des esters peut s'effectuer en milieu acide[18, 19, 116] ou en milieu basique[117-120]. En milieu basique, la dernière étape de rinçage peut se faire avec de l'eau ou avec un acide.

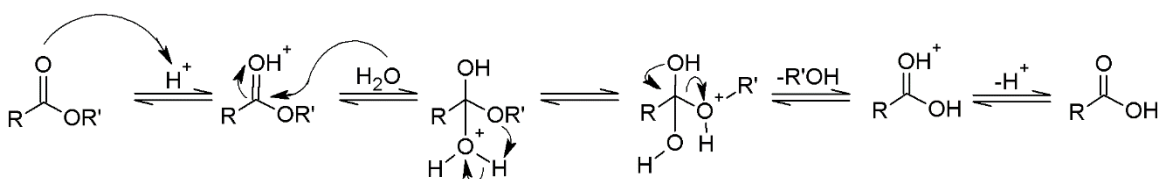


Figure 15. Mécanisme d'hydrolyse d'un ester en condition acide.

Pour la réaction d'hydrolyse catalysée en milieu basique, si de l'eau est utilisée en grande quantité pour rincer après la réaction, le produit résultant sera celui avec le groupement acide carboxylique. Dans un second cas, une source d'acide peut être utilisée comme solution de rinçage afin d'obtenir l'acide carboxylique.

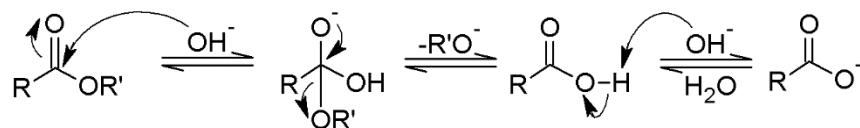


Figure 16. Mécanisme d'hydrolyse d'un ester en condition basique suivie d'un rinçage à l'eau.

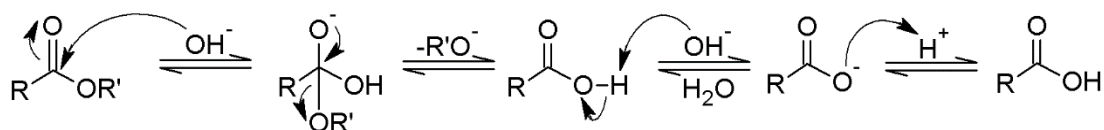


Figure 17. Mécanisme d'hydrolyse d'un ester en condition basique suivi d'un rinçage acide.

2.4. Polymérisation radicalaire en émulsion

Cette technique permet de synthétiser un copolymère possédant des ratios précis de motifs choisis. Il est aussi possible de contrôler la masse moléculaire.

2.4.1. Principes de fonctionnement

La polymérisation en émulsion peut avoir lieu lorsque tous les monomères sont insolubles dans le milieu réactionnel, l'eau par exemple. À l'aide d'un tensioactif comme le dodécylsulfate de sodium (SDS) et d'une vive agitation dans un réacteur, les monomères se retrouvent dispersés en fines gouttelettes. Une stabilisation par le SDS se fait si celui-ci est présent dans une concentration supérieure à la concentration micellaire critique. L'amorceur utilisé, comme le persulfate de potassium (KPS), doit être soluble dans le

milieu réactionnel. À une température de 80°C, celui-ci se décompose en deux radicaux libres. Dans le milieu, certaines molécules de monomère se retrouvent faiblement solubilisées. Elles réagissent alors avec un radical libre présent afin de créer une réaction d'amorçage. Le monomère possédant un radical réagit avec un autre monomère faiblement dissous dans l'eau. Après quelques réactions, des oligoradicaux se forment dans l'eau. Lorsque les oligoradicaux réagissent avec plusieurs monomères, leur solubilité dans l'eau diminue. Ceux-ci entrent alors au centre des micelles de SDS. Les micelles d'oligoradicaux sont de petites tailles en comparaison aux gouttelettes de monomères, mais leur surface spécifique est supérieure. C'est pour cette raison que les oligoradicaux ont statistiquement plus de chance d'entrer dans les micelles que dans les gouttelettes de monomères. Pour la suite de la polymérisation, les gouttelettes libèrent des monomères qui seront peu solubilisés dans l'eau, ceux-ci approvisionnent alors les micelles jusqu'à l'arrêt de la polymérisation. [121, 122]

2.4.2. Agent de transfert de chaîne

Les chaînes polymériques actives et en cours de croissance possèdent un radical. Le n-butanethiol peut réagir avec ces chaînes en croissance pour se retrouver lui-même à l'état radicalaire. Les chaînes polymériques ne sont alors plus actives. Le radical de n-butanethiol peut alors réagir avec un monomère pour effectuer un nouvel amorçage. La propriété radicalaire est alors échangée plusieurs fois de chaîne et cela donne la possibilité de créer plus de chaînes par une réaction d'amorçage supplémentaire et différente. Ce phénomène a pour effet de créer des polymères de plus basse masse moléculaire.

2.4.3. Relation de Gordon et Taylor

Il est possible de faire varier la température de transition vitreuse (T_g) d'un copolymère aléatoire en faisant varier le ratio des motifs qui le compose. Une relation comme celle de Gordon et Taylor [123] permet d'estimer la T_g du copolymère résultant d'un mélange de deux monomères. La T_g du copolymère se situera entre les T_g que possède habituellement chacun des homopolymères.

$$T_g = \frac{T_{g1} + (KT_{g2} - T_{g1})W_2}{1 - (1 - K)W_2} \quad (1)$$

- T_g : Température de transition vitreuse du copolymère
- T_{g1} : Température de transition vitreuse de l'homopolymère 1
- T_{g2} : Température de transition vitreuse de l'homopolymère 2
- K : Constante
- W_2 : Fraction massique du monomère 2

2.4.4. Relation de Flory-Fox

La température de transition vitreuse d'un polymère peut être influencée d'autres caractéristiques des chaînes polymériques. Selon la relation de Flory-Fox [123], la température de transition vitreuse diminue lorsque la masse moléculaire moyenne en nombre diminue. Avec des chaînes polymériques plus courtes, les bouts de chaîne deviennent plus nombreux, augmentant par le fait même le volume libre, ce qui facilite la fluidification.

$$T_g = T_{g\infty} - \frac{C}{\bar{M}_N} \quad (2)$$

T_g : Température de transition vitreuse
 $T_{g\infty}$: Température de transition vitreuse limite
 C : Constante
 \overline{M}_N : Masse moléculaire moyenne en nombre

2.5. L'impression 3D

L'impression tridimensionnelle (3D) est un processus de conception d'objet fabriqué couche par couche. La technique de dépôt de fil en fusion (FDM de l'anglais *Fused deposition modeling*) utilisée pour ce projet a été développée vers 1980 par Scott Crump de Stratasys Ltd.

Cette technique consiste globalement à déposer un mince filament d'une matière à l'état fluide sur une surface. Une fois sur la surface, la matière durcit selon un principe de refroidissement, par exposition à un rayonnement ou selon d'autres méthodes tout dépendant du type de matière déposée.

La technique d'impression 3D FDM est compatible avec plusieurs types de matériaux. Ceux qui sont le plus généralement utilisés sont les suivants :

- Les thermoplastiques ayant la capacité de se fluidifier par leur passage à travers un module chauffé et ensuite de se solidifier en refroidissant sur la surface d'impression.
- Les résines photopolymérisables se retrouvant initialement à l'état fluide passent par un module de déposition et sont solidifiées par polymérisation à l'aide d'une exposition à une longueur d'onde précise lorsqu'ils sont sur la surface.
- Les gels sont fluides lorsqu'ils sont faiblement chauffés par le module de déposition et ils sont par la suite solidifiés par refroidissement sur la surface d'impression.

2.5.1. Avantages de la technique

Les techniques traditionnelles de fabrication des biocapteurs utilisent plusieurs types de support différents pour les complexes biochimiques. Les supports utilisés ont chacun des avantages et des inconvénients rapportés dans le tableau 3.

La photolithographie est une technique de fabrication prometteuse, car les possibilités de fabrication sont grandes. Par contre, les inconvénients de cette technique en termes d'installations coûteuses, de fabrication longue et de complexité de fabrication, font de celle-ci une technique moins favorable dans un contexte de recherche.

Tableau 3. Comparaison de supports existants pouvant être utilisés dans la conception de biocapteurs.

	Avantages	Inconvénients
Plaque 96 puits	<ul style="list-style-type: none">- Technique bien documenté- Résultats quantitatifs	<ul style="list-style-type: none">- Nécessite au moins 80 échantillons- Besoin d'un lecteur de plaque dispendieux
Papier	<ul style="list-style-type: none">- Peu coûteux- Peu d'équipements requis	<ul style="list-style-type: none">- Détection semi-quantitative
Électrode avec biofilm	<ul style="list-style-type: none">- Plus précis que le support en papier	<ul style="list-style-type: none">- Nécessite d'autres électrodes pour compléter le système électrochimique
Électrode imprimée	<ul style="list-style-type: none">- Réutilisation possible	<ul style="list-style-type: none">- Technique de fabrication complexe
Photolithographie	<ul style="list-style-type: none">- Permet une fabrication diversifiée- Réutilisation possible	<ul style="list-style-type: none">- Technique longue- Installation coûteuse

L'impression tridimensionnelle par la méthode FDM est plus accessible, des logiciels de dessin sont disponibles gratuitement, les dessins sont simples à concevoir, l'appareil

d'impression offre plusieurs variations possibles grâce aux multiples modules de déposition, le matériel est peu coûteux et les modifications d'un dispositif prototype sont rapides et faciles à effectuer. Pour ces nombreuses raisons, l'utilisation d'un tel équipement pour le développement de cette nouvelle gamme de biocapteurs est une bonne avenue en recherche. Dans un autre ordre d'idée, les dispositifs conçus pour un instrument d'impression 3D peuvent être intégralement transférés à un autre instrument d'impression 3D ce qui met en évidence l'objectif d'accessibilité de la nouvelle gamme de biocapteurs.

2.5.2. Les thermoplastiques

Les thermoplastiques sont les matériaux les plus fréquemment utilisés avec la méthode d'impression FDM. Ceux-ci doivent être mis en forme avant de pouvoir être utilisés avec l'imprimante. Ils doivent être acheminés aux modules de déposition en filament de 1,75 mm de diamètre. De plus, ces thermoplastiques doivent avoir une température d'impression comprise entre 150°C et 450°C selon le modèle de tête utilisé. Plusieurs thermoplastiques sont commercialement disponibles en filament : polycarbonate (PC), acrylonitrile butadiène styrène (ABS), acrylonitrile styrène acrylate (ASA), acide polylactique (PLA), nylon, polyéthylène téréphtalate (PET), polyéthylène téréphtalate modifié au glycol (PETG), polyétheréthercétone (PEEK), polypropylène (PP), alcool polyvinylique (PVA), polystyrène à haut impact (HIPS), polyuréthane (PU), polyméthacrylate de méthyle (PMMA) et quelques autres mélanges développés au fil des avancées technologiques possédant du butadiène-méthacrylate de méthyle-styrène, des substances magnétiques ou conductrices d'électricité.

Chapitre 3

MÉTHODOLOGIE

3.1. Sélection des thermoplastiques

Le dispositif créé pour ce projet se compose de trois sections; la structure, les canaux et la section d'analyse. Avec la technologie d'impression 3D, il est possible de sélectionner un thermoplastique différent pour chaque section. Cela permet de mieux répondre aux besoins spécifiques de chaque section.

3.1.1. Structure du biocapteur

L'ensemble du dispositif, la structure, doit être constitué d'un thermoplastique facilement imprimable. Celui-ci doit supporter les conditions d'opération du biocapteur. Il doit être résistant dans un milieu aqueux et résistant aux produits utilisés pour la fonctionnalisation et la détection. Il ne doit pas interférer avec le mécanisme de biodétection.

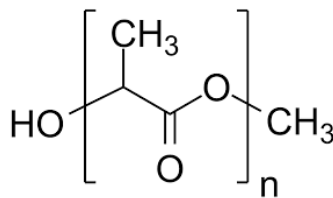


Figure 18. Représentation de l'acide polylactique (PLA).

Pour cette partie du biocapteur, l'acide polylactique (PLA) respecte toutes les conditions. De plus, ce thermoplastique est accessible commercialement en filament utilisable par

l'imprimante 3D. Le filament choisi est le In-PLA, qui est un grade de PLA distribué par la compagnie taulman3d. Le Tableau 4 présente les propriétés du filament. Celles-ci sont toutes importantes, surtout la résistance mécanique qui assure une intégrité au dispositif. De plus, la température d'impression de 210°C est adéquate pour que le filament puisse être utilisé avec l'imprimante.

Tableau 4. Propriétés du filament thermoplastique de In-PLA de Taulmann 3D [124]

Propriétés	Valeurs
Masse volumique	1,243 g/cm ³
Indice de fluidité à chaud	4,10 g/10min. (210°C / 2.160 kg)
Résistance à la traction	10 ksi
Module de traction	539,7 ksi
Allongement à la rupture	3,5%
Résistance au choc Izod	2,8 pi-lb/po
Résistance au choc Gardner	0,17 pi-lb
Module de flexion	488,2 ksi
Température de déformation	56°C (264psi)
Température de ramollissement Vicat	66°C (@50N, 120°C)
Température de transition vitreuse	65°C
Température d'impression	210°C
Transmission optique	90%

3.1.2. Les canaux du biocapteur

Le biocapteur sera un dispositif fluide dont la structure est munie de canaux en son centre. C'est dans ces canaux que se déroulent les étapes de fonctionnalisation et de biodétection. Avec la technique d'impression FDM, il est préférable de toujours laisser s'écouler un thermoplastique sur une surface pleine et non au-dessus d'un vide. Il est donc préférable que les canaux soient constitués d'un thermoplastique soluble sacrificiel. Celui-ci sera retiré par dissolution après l'impression complète du dispositif. Les

thermoplastiques solubles les plus couramment utilisés et les plus disponibles sur le marché pour l'impression 3D sont le polystyrène de haut impact (HIPS) et l'alcool polyvinylique (PVA). Le HIPS est soluble dans le d-limonène [125] et le PVA est soluble dans l'eau [126]. L'efficacité de ces deux matériaux est comparée pour l'impression et l'utilisation à l'intérieur des dispositifs.

3.1.3. La section de détection du biocapteur

Dans le dispositif développé, un autre matériel thermoplastique peut être utilisé pour constituer la section de fonctionnalisation et de biodétection. Le thermoplastique sélectionné doit être imprimable de façon uniforme. Il doit être solide et résistant aux étapes de traitement. Tel que précisé dans la section 2.1.2, le transducteur qui sera utilisé devra détecter un signal de fluorescence. Le thermoplastique choisi pour cette partie du dispositif doit donc être transparent dans les longueurs d'onde du spectre du visible et plus précisément, à celle d'excitation et d'émission du fluorophore choisi. De plus, afin de permettre la fonctionnalisation sur sa surface, le thermoplastique devra posséder des groupements permettant la fixation de composés biologiques. Les groupements peuvent être des acides carboxyliques disponibles à la surface en grande quantité.

Actuellement, il n'existe pas de thermoplastique commercial qui possède tous les prérequis et qui est disponible en filament prêt pour l'impression tridimensionnelle par la méthode FDM. Deux stratégies de développement sont envisagées afin de concevoir la partie du dispositif responsable de la fonctionnalisation. Dans un premier temps, un copolymère disponible commercialement en granules a été étudié pour l'efficacité de la modification des groupements fonctionnels. Par la suite, la fabrication de copolymères en laboratoire a été effectuée afin d'obtenir un thermoplastique possédant les propriétés recherchées.

3.2. Modification de polymères commerciaux en vue d'effectuer la fonctionnalisation

Cette première stratégie consiste à utiliser un thermoplastique commercialement disponible et à en modifier sa surface après l'impression complète. Le thermoplastique choisi est un copolymère de méthacrylate de méthyle et d'acrylate d'éthyle (P(MMA-EA)). Ce copolymère a été sélectionné pour ses propriétés thermomécaniques et de résistance aux milieux aqueux. De plus, les acrylates possèdent une bonne transparence aux longueurs d'onde du visible [110], incluant celles requises pour la détection du fluorophore de 492 à 535 nm. L'évaluation de la transparence est présentée au chapitre 4. Étant solide à la température de la pièce, il acquiert une bonne fluidité à la température d'opération normale des modules de déposition, soit autour de 200°C [127], ce qui en fait donc un bon thermoplastique imprimable.

Ce polymère est disponible en granules (*Plexiglas® VS-100 acrylic Resin, Arkema*). Celles-ci doivent préalablement être converties en filament de 1,75 mm afin de pouvoir être utilisées en impression 3D. Des plaques de ce matériau (*Clear Cast Acrylic Sheet 8560K171, McMaster*) seront aussi utilisées pour les expérimentations.

Toutefois, ce type de matériel ne dispose pas d'acide carboxylique en surface disponible pour effectuer la fonctionnalisation. Malgré cela, le matériel sous sa forme de polymère possède des groupements disponibles d'esters méthyliques et d'esters éthyliques. Ces esters sont des groupements fonctionnels pouvant subir une hydrolyse ayant pour résultat la formation de groupements d'acide carboxylique [116, 128]. Une bonne condition d'hydrolyse permet de modifier les groupements fonctionnels en surface seulement sans solubiliser le matériel.

Ce copolymère pourrait donc être imprimé sans modification préalable avec les autres thermoplastiques afin de former le dispositif. Par la suite, la surface interne des canaux

pourrait être hydrolysée par des conditions réactionnelles optimales dans un objectif de fonctionnalisation.

3.2.1. Préparation des surfaces

Pour cette stratégie, les essais de modification s'effectuent d'abord sur des petites surfaces et non à l'intérieur d'un dispositif fluide. Ces surfaces sont des plaquettes et des films faites de P(MMA-EA).

Plaquettes commerciales de P(MMA-EA)

Les plaquettes commerciales (*McMaster*) sont utilisées dans les expériences d'hydrolyse, car elles possèdent une surface lisse, plane et régulière. Grâce à cette régularité, il est plus facile d'effectuer les analyses avec les techniques de caractérisation des surfaces. Les résultats obtenus par spectroscopie infrarouge en mode de réflexion totale atténuée, par microscopie épifluorescente et par spectroscopie de photoélectrons X sont de meilleure qualité.

Pour la fabrication de ces surfaces, une plus grande plaque de P(MMA-EA) a été taillée afin d'obtenir des plaquettes d'une dimension de 7 mm x 7 mm x 1,5 mm.

Plaquettes imprimées de P(MMA-EA)

Ces plaquettes sont fabriquées à partir des granules (*Arkema*). Dans ce cas, la fabrication d'un filament doit d'abord être effectuée. Pour ce faire, l'extrudeur Filabot (section 3.6.1) peut être utilisé. Le filament peut ensuite être imprimé avec les paramètres adéquats définis

pour ce thermoplastique (section 4.1.1). Les plaquettes d'une dimension de 7 mm de côtés et d'une épaisseur de 1,5 mm sont produites afin d'effectuer les essais de fonctionnalisation.

Les plaquettes imprimées sont utilisées pour étudier les phénomènes d'hydrolyse, car elles représentent le thermoplastique tel qu'il serait dans le biocapteur, après avoir subi toutes les étapes de mise en forme du filament et de l'impression. En comparaison avec les résultats obtenus pour les plaquettes commerciales, il sera possible de conclure si les étapes de mise en forme du thermoplastique modifient la nature et la réactivité de celui-ci.

Films minces de P(MMA-EA)

Comme troisième surface, des films minces ont été fabriqués à partir d'une solution de granules (*Arkema*) à 5% m/v dans le chlorobenzène. Cette solution fût déposée sur des surfaces de verres et étalée par dépôt centrifuge (en : *spin coating*). Pour la mise en forme du film, la chambre de dépôt fût d'abord saturée en vapeur de chlorobenzène. Une lamelle de microscope en verre de 25 mm² fût ensuite recouverte de solution de thermoplastique. Pour que le dépôt soit mince et uniforme, l'instrument (*SCS 6800, Type H*) tourne ensuite à une vitesse de 1000 rotations par minute (rpm) pendant 10 secondes. Une cuisson de 2 minutes à 200°C est effectuée afin d'éliminer le solvant.

Ces films minces seront utilisés afin de vérifier si l'épaisseur de la surface influence les résultats de caractérisation.

3.2.2. Hydrolyse du P(MMA-EA)

Plusieurs conditions d'hydrolyse qui sont proposées dans la littérature, en présence d'acide sulfurique [19, 116], d'acide chlorhydrique [19], d'hydroxyde de sodium [117-120] ou

d'acide trifluoroacétique [129] ont été essayées au cours de ce projet. La réaction du polymère en présence de peroxyde d'hydrogène est une autre condition essayée, même si elle n'est pas présente dans la littérature à ce jour. Elles ont toutes été comparées afin de déterminer laquelle permet d'obtenir des groupements d'acide carboxylique avec le plus d'efficacité.

Étant donné que le support du dispositif sera constitué de PLA, la résistance de celui-ci face aux conditions d'hydrolyse a aussi été évaluée.

3.3. Synthèse de copolymère en laboratoire pour la fonctionnalisation

Étant donné qu'il n'existe actuellement pas de filament disponible sur le marché possédant les groupements adéquats pour effectuer la liaison de composés organiques, il est possible de synthétiser un polymère en laboratoire répondant aux critères recherchés. La méthode de polymérisation radicalaire en émulsion est utilisée.

3.3.1. *Propriétés requises*

Le nouveau thermoplastique doit posséder des caractéristiques précises et il doit respecter les conditions suivantes :

- a) Il doit permettre d'obtenir une grande quantité de groupement COOH disponible en surface.
- b) Le thermoplastique doit être insoluble dans l'eau, car l'eau est le média d'analyse des contaminants.

- c) La température de transition vitreuse (T_g) doit être supérieure à la température maximale d'utilisation du prototype final, pour que celui-ci ne se déforme pas pendant son utilisation.
- d) La T_g doit toutefois être assez basse pour permettre au matériel de se fluidifier aux températures d'opération des modules de déposition de l'imprimante 3D. Les T_g des thermoplastiques habituellement utilisés pour l'impression 3D sont entre 65°C et 150°C. Plus une T_g est basse, plus la température nécessaire pour obtenir une mobilité des chaînes est basse et plus la viscosité diminue.
- e) La température de dégradation (T_d) du polymère doit être plus élevée que la température d'opération des modules de déposition. Elle doit donc être beaucoup plus élevée que la T_g pour permettre un grand domaine de température d'impression.
- f) Le thermoplastique doit être transparent aux longueurs d'onde d'analyse du fluorophore, soit minimalement entre 492 et 535 nm. Il ne doit donc pas absorber les rayonnements à ces longueurs d'onde. Il doit de plus être uniforme pour conserver la transparence et ne pas diffuser les rayonnements le traversant.
- g) Il doit avoir une masse molaire moyenne en masse (M_w) assez basse pour atteindre une basse viscosité lorsqu'il est fluidifié dans les modules d'impression [130]. Un polymère possédant une M_w plus faible se compose de chaînes plus courtes, ce qui diminue la viscosité de celui-ci. Des essais préliminaires effectués avec des échantillons de polyméthacrylate de méthyle (PMMA) de plusieurs M_w ont permis de conclure qu'un thermoplastique de cette catégorie se fluidifie mieux à 200°C si sa M_w est inférieure à 100 000 g/mol.
- h) Le copolymère doit être stable, il ne doit pas s'altérer en fonction du temps. Il ne doit pas dégrader, ni changer de couleur, ni perdre ses propriétés.

3.3.2. Détermination des monomères

Les copolymères ayant un squelette acrylique sont un bon point de départ. Souvent, ils possèdent plusieurs des propriétés énumérées ci-dessus par rapport à la résistance à l'eau, la T_g , la T_d , la transparence, la masse molaire et la stabilité. Dans les copolymères commerciaux, la partie correspondant au méthacrylate de méthyle (MMA) est la plus élevée. Le pourcentage de la partie correspondant à l'acrylate d'éthyle (EA) varie de 7% à 12% (annexe A et B).

Le monomère principalement utilisé sera donc le méthacrylate de méthyle. L'ajout de monomère d'acrylate d'éthyle permet de diminuer la température de transition vitreuse du copolymère. En effet, un homopolymère de MMA possède une T_g d'environ 105°C, tandis qu'un homopolymère d'acrylate d'éthyle possède une T_g de -22°C [131]. Un mélange de MMA et EA permet donc d'obtenir une T_g entre les deux, comme l'indique la relation de Gordon et Taylor [123]. Cela permet alors d'augmenter la viscosité lors de la fluidification. La quantité d'acrylate d'éthyle utilisée sera d'au moins 12% de la masse totale des monomères. Ce ratio devrait permettre une bonne impression du thermoplastique, étant donné la similitude avec les thermoplastiques utilisés sur le marché. Il est important de mentionner que la variation de la tacticité d'un polymère peut aussi faire varier la température de transition vitreuse de quelques degrés [132]. Toutefois, ce paramètre ne sera pas étudié dans la présente recherche.

Un autre critère important à respecter correspond à la présence d'acide carboxylique dans le thermoplastique. Il n'est pas possible d'utiliser un copolymère possédant déjà des fonctions -COOH si celui-ci doit être imprimé en 3D ultérieurement. Premièrement, la température de transition vitreuse est plus élevée lorsqu'un polymère possède des fonctions acides carboxyliques. Cette augmentation de la T_g est causée par les liaisons hydrogène nombreuses. Par exemple, la T_g du PMMA est de 105°C [132] tandis que celle du poly(acide méthacrylique) PMAA est de 160°C [133]. Une T_g plus haute cause alors une diminution de la viscosité en impression 3D. Deuxièmement, lors du chauffage d'un

polymère possédant des groupements libres -COOH, il se produit une réticulation physique. À cause de ces phénomènes, des polymères possédant des -COOH ne peuvent pas être utilisés s'ils doivent être chauffés, ce ne sont pas de bons thermoplastiques imprimables. Comme le polymère devra être chauffé dans le cas de notre dispositif en impression 3D, une autre solution est envisagée.

Afin d'obtenir la présence d'acide carboxylique de manière plus efficace, un monomère d'acrylate de *tert*-butyle peut être ajouté au copolymère. Une fois polymérisé, l'ester de *tert*-butyle est facilement hydrolysable pour obtenir des acides carboxyliques. L'hydrolyse peut se faire avec de l'acide trifluoroacétique (TFA) [129]. Afin de conserver les propriétés correspondant aux copolymères commerciaux, une quantité équivalente à 10% de la masse totale des monomères est d'abord choisie pour l'acrylate de *tert*-butyle. De plus, afin de diminuer la masse moléculaire du polymère, le *n*-butanethiol est utilisé comme agent de transfert de chaîne [134]. D'après la relation de Flory-Fox [123], une masse moléculaire plus petite permet de diminuer la T_g d'un polymère. Cela permet donc d'améliorer les capacités de fluidification.

3.3.3. Matériel et méthode

La polymérisation est effectuée en émulsion dans l'eau à l'aide d'un réacteur en verre à double paroi muni d'un régulateur de température. Le méthacrylate de méthyle (1,56 mol), l'acrylate d'éthyle (243 mmol) et l'acrylate de *tert*-butyle (156 mmol) ont été filtrés sur de l'oxyde d'aluminium basique (Brokman no1) pour retirer les inhibiteurs avant d'être ajoutés dans le réacteur avec 500 mL d'eau. Le tensioactif dodécylsulfate de sodium (SDS) (17mmol), le bicarbonate de sodium (NaHCO_3) (17 mmol), l'amorceur de persulfate de potassium (KPS) (4 mmol) et l'agent de transfert de chaîne *n*-butanethiol (4 mmol) ont été ajoutés dans le réacteur par la suite.

Le mélange réactionnel est mis sous forte agitation de manière à créer l'émulsion. De l'azote est bullé dans le mélange pendant 15 minutes afin de retirer une grande partie de l'air. Par la suite, le mélange est chauffé à 80°C pendant 8 heures, sous agitation et sous atmosphère d'azote.

Suivi de la réaction

Après 8 heures de réaction, un échantillon de l'émulsion est prélevé dans le réacteur. Celui-ci est pesé et ensuite séché afin d'éliminer l'eau et les monomères n'ayant pas polymérisé. L'échantillon est pesé une fois de plus après le séchage. La perte de masse est calculée en tenant compte des autres réactifs solides présents. La quantité de monomères restant dans l'échantillon peut alors être déduite afin de savoir si la réaction est complète.

Purification

L'émulsion de polymère est déstabilisée avec du chlorure de calcium afin de faire précipiter le polymère. Le précipité est filtré et est lavé avec un litre d'eau suivi d'un litre de méthanol. La poudre résultante du copolymère P(MMA-EA-tBuAcr) est ensuite séchée dans une étuve à 60°C.

3.3.4. Préparation de surfaces d'analyse

Les surfaces d'analyses ont été fabriquées à partir d'un mélange de la poudre de copolymère et d'acétone mis à sécher dans un pétri. La feuille de polymère a ensuite été découpée en carrés d'environ 1cm. Ces surfaces sont fabriquées dans le but de caractériser

le copolymère et d'étudier le potentiel de fonctionnalisation avec les composés biologiques.

Pour l'utilisation dans un biocapteur imprimé en 3D, la poudre de copolymère doit être introduite dans un extrudeur afin de former un filament (section 3.6). Le filament peut ensuite être utilisé pour l'impression du dispositif. Les réactions se font alors après l'impression, à l'intérieur du dispositif.

3.3.5. Traitement acide

Le traitement du copolymère se fait avec une solution à 30% en acide trifluoroacétique (TFA) dans l'eau. Celui-ci a été sélectionné pour son efficacité à modifier le groupement ester de *tert*-butyle en groupement acide carboxylique. Le temps de réaction a été varié afin de vérifier l'efficacité du traitement.

3.4. Fonctionnalisation biologique

Toutes les surfaces polymériques étudiées dans les deux stratégies de ce projet ont été fonctionnalisées avec une séquence immunologique pour l'IgG [112]. Cette séquence permet de vérifier le potentiel de formation d'une liaison covalente avec des anticorps.

Immunologie pour IgG

Un des premiers objectifs de ce développement repose sur la preuve de la viabilité de cette nouvelle gamme de biocapteurs. De ce fait, des composés biologiques bien connus et bien étudiés sont d'abord utilisés à la place des cyanotoxines. Le premier composé est un

anticorps nommé immunoglobuline G (IgG) provenant du lapin (*Sigma, I8140*). Le second composé est un autre anticorps qui sera nommé anti-Immunoglobuline G (anti-IgG) (*Sigma, F0382*). L'anti-IgG provient d'un hôte de chèvre et il est spécifique à l'IgG de lapin. L'anti-IgG sera étiqueté par le FITC (anti-IgG-FITC), le même fluorophore qui peut être utilisé dans la détection de la MC-LR.

La séquence de détection afin de vérifier le système se fera par la fixation de l'IgG sur la paroi du biocapteur. Cette étape sera suivie par l'ajout de l'anti-IgG-FITC qui se liera aux IgG présents en surface (figure 19).

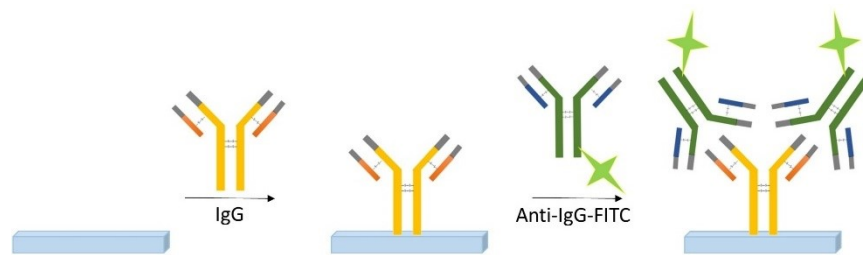


Figure 19. Exemple de séquence de détection immunologique

3.4.1. Activation

L'activation de la surface se fait avec une solution de EDC (2,5 mM) et de NHS (5Mm) dans un tampon d'acide 2-(N-morpholino)ethanesulfonique (MES) (0,1 M, pH 4.85). Les échantillons sont déposés dans la solution pour une durée de 30 minutes. Ils sont ensuite rincés abondamment avec la solution de tampon MES.

3.4.2. Liaisons biorécepteurs IgG

Les échantillons activés sont rincés avec un tampon phosphate (PBS) (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ * 7 H₂O, 1,76 mM KH₂PO₄, pH 7,28) pour conditionner les échantillons au pH adéquat de la présente réaction. Les échantillons sont placés dans une solution d'IgG (0,0364 mg/mL dans le PBS) pendant une heure à 4°C. Après la réaction, ils sont rincés avec la solution de tampon PBS.

3.4.3. Liaison d'affinité IgG

Les échantillons qui ont été fonctionnalisés avec IgG sont placés dans la solution d'anti-IgG-FITC (0,016 mg/mL dans le PBS) pendant une heure à 4°C afin de réaliser la liaison d'affinité entre les deux composés biologiques. Les échantillons sont rincés avec le tampon PBS et séchés sous azote.

3.5. Techniques de caractérisation

3.5.1. Microscope optique en mode interférométrie à balayage vertical

L'appareil utilisé pour ce projet afin de vérifier l'aspect des surfaces et l'épaisseur des films est le Contour GT-I (*Bruker*) muni d'une lentille de grossissement de 5 fois. La technique employée fut le balayage d'interférence vertical (en : Vertical Scanning Interferometer). Pour déterminer l'épaisseur des films de polymère qui se trouvent sur des lamelles de verre, une fine rayure a été faite avec une lame de rasoir à travers l'épaisseur du film. Lorsque l'échantillon est analysé, il est possible d'observer la différence de hauteur entre

l'interférence de la surface du film et l'interférence provenant de la surface du verre. Cette différence de hauteur représente l'épaisseur du film.

3.5.2. FTIR-ATR

La spectroscopie infrarouge à transformé de Fourier (*Vertex-80, Bruker, détecteur Mercure-Cadmium-Tellure*) muni d'un module de réflexion totale atténuée (*Specac's Golden Gate™ ATR*) (FTIR-ATR) est utilisée dans le but d'identifier les liaisons présentes à la surface des échantillons. Ainsi, si les conditions expérimentales modifient les groupements à la surface, les signaux observés par FTIR-ATR seront modifiés. Le module d'analyse ATR permet une analyse de la surface des échantillons, mais les ondes peuvent pénétrer l'échantillon sur environ 2 μm [135].

3.5.3. Calorimétrie différentielle à balayage

La technique employée au cours de ce projet pour déterminer la température de transition vitreuse des thermoplastiques est l'analyse de calorimétrie différentielle à balayage (*TA Instrumetns, Q2000*) (DSC). L'expérimentation s'est déroulée en trois étapes. Un premier chauffage a été fait, suivi d'un refroidissement et d'un deuxième chauffage. Le résultat est extrait des données du deuxième chauffage.

3.5.4. Spectromètre à résonance magnétique nucléaire

La composition des copolymères de provenance commerciale a été évaluée par spectrométrie à résonance nucléaire de proton (RMN ^1H) en phase liquide avec un

appareil à 300MHz (*Bruker, modèle Avance III*). Les échantillons de thermoplastique ont été dissous dans le chloroforme deutéré et analysés. Les ratios entre les différents protons observés permettent de déterminer le ratio des motifs polymériques.

3.5.5. Chromatographie de perméation de gel

La masse moléculaire moyenne en masse (M_w) du copolymère synthétisé a été déterminée par chromatographie de perméation de gel (*Agilent Technologies GPC/SEC System*) (GPC). Le copolymère a été analysé en solution dans le tétrahydrofurane.

3.5.6. Fluidité des copolymères

L'objectif d'étudier la fluidité est de déterminer à quelle température les chaînes de polymère s'enchevêtrent pour former un objet moulé ou extrudé uniforme. Il est nécessaire d'être au-dessus de la T_g pour permettre la mobilité des chaînes. Par contre, la température adéquate doit être déterminée pour chaque thermoplastique.

Presse chauffée

Cette expérimentation consiste à comprimer une petite quantité d'échantillon de thermoplastique entre deux feuilles minces d'aluminium à une température sélectionnée et sous une pression allant jusqu'à 1 Torr. Il est alors possible de constater la température minimale nécessaire pour que l'échantillon se fluidifie et forme une pastille uniforme. Cela permet aussi de remarquer à quelle température la dégradation du copolymère débute. La

dégradation peut être indiquée par la formation de bulles à l'intérieur de la pastille pressée ou par la coloration de celle-ci.

Fluidification sans pression

Une autre méthode d'observation de la fluidification a été utilisée, mais sans l'application de pression sur l'échantillon. Pour cette technique, des capillaires fermés en verre ayant un diamètre interne de 1,5 à 1,8 mm sont utilisés. Une petite quantité de thermoplastique est insérée au fond afin de remplir le capillaire sur une hauteur de 1 cm. Les tubes sont ensuite placés dans un système chauffant (*Thermo Scientific, 1402Q*). La température du système a été augmentée de 70°C à 350°C à une vitesse de 10 °C/minute. Les tubes ont été observés à l'aide d'une caméra pendant l'augmentation de la température.

3.5.7. Transparence des thermoplastiques

Pour effectuer cette analyse, un spectrophotomètre UV-visible (*UV-1800, Shimadzu Scientific Instruments*) a été utilisé avec des longueurs d'onde variant de 350 nm à 700 nm. Les échantillons de thermoplastique ont été insérés dans le porte-échantillon à la place de la cuvette. Le pourcentage de transmittance a été obtenu pour chaque longueur d'onde.

3.5.8. Dosage colorimétrique d'acide carboxylique

Le dosage colorimétrique a été utilisé pour déterminer le rendement de réaction d'hydrolyse sur les surfaces de thermoplastique. Cette technique permet de déterminer le nombre de groupements acides carboxyliques qui sont à la surface de l'échantillon et qui

sont libres de réagir. En milieu basique, à un pH de 11, l'*ortho*-toluidine bleu (TBO, 0,512mM) peut se lier de façon covalente aux acides carboxyliques présents en surface [128, 136-138]. Les pièces sont laissées dans cette solution pendant 2 heures. Ensuite, le rinçage est effectué avec une solution basique (NaOH, pH 11) pour éliminer les molécules non liées. Le TBO lié à la surface peut ensuite être récupéré quantitativement par rinçage avec une solution aqueuse d'acide acétique à 50% utilisée en quantité précise. La solution de rinçage est récupérée pour chaque pièce. L'absorbance de la molécule de TBO présente dans la solution de rinçage est mesurée à 625nm par un spectrophotomètre UV-visible (*UV-1800, Shimadzu Scientific Instruments*). La quantité de TBO présente dans la solution de rinçage est déterminée par étalonnage externe et par l'utilisation de la relation de Beer-Lambert. Il est considéré que chaque molécule de TBO se liera avec un groupement d'acide carboxylique. La quantité de groupement d'acide carboxylique peut donc être déterminée.

3.5.9. *Angle de contact*

La mesure d'angle de contact d'un liquide sur une surface solide permet de déterminer l'énergie du liquide ou de la surface. Lorsque l'analyse se fait avec de l'eau, il est possible de déterminer le caractère hydrophile des surfaces. La présence d'acide carboxylique peut rendre une surface plus hydrophile [19]. Pour l'analyse, des gouttes d'eau de 30 microlitres sont déposées sur les surfaces. Une photo de chaque goutte est prise afin de déterminer l'angle entre la surface sous la goutte et le côté de la goutte. Une goutte possédant un angle de contact plus petit que 90° indique un caractère hydrophile tandis qu'un angle supérieur à 90° indique un caractère de surface hydrophobe.

3.5.10. Spectroscopie de photoélectrons rayon X

Cette technique permet d'obtenir de l'information provenant essentiellement de la surface d'un solide. L'information provient d'une épaisseur d'environ 0,5 à 10 nanomètres en surface [139]. L'intensité du signal provenant de l'intérieur de l'échantillon est donc moins grande que par la technique FTIR-ATR. Un appareil de spectroscopie de photoélectrons rayon X (*Kratos Axis Ultra*) avec une source monochromatique d'Aluminium a été utilisé selon la méthode de Louette *et al* (2005) [140].

3.5.11. Stéréomicroscope en épifluorescence

Pour effectuer l'analyse des fluorophores présents sur les surfaces, il est possible d'utiliser un stéréomicroscope (*Leica MZFLIII*) muni d'un module épifluorescence (*Endow GFP Longpass, HQ470/40, HQ500lp*), d'une caméra (*Leica DC 300 F*) et des objectifs grossissants 5, 10 et 20 fois (*HC PL Fluotar*). Après l'acquisition d'images, les calculs sont effectués avec un logiciel d'analyse d'image (*Image J*), selon les mêmes paramètres de luminosité et de sensibilité pour toutes les photos. Les analyses d'images permettent d'obtenir un pourcentage de surface fluorescente, donc un pourcentage équivalent de surface fonctionnalisée.

3.6. Mise en filament de thermoplastique

Pour qu'un thermoplastique puisse être utilisé en impression 3D, il faut que celui-ci soit sous forme de filament. Un extrudeur est un appareil qui fait l'extrusion du thermoplastique afin d'obtenir les filaments. Pour ce faire, des granules ou de petits morceaux de thermoplastique d'un diamètre maximal de 0,3 cm peuvent être utilisés [141]. L'appareil

est d'abord préchauffé à la température sélectionnée. Les compagnies distribuant les granules fournissent la température optimale pour que le matériel se fluidifie. L'ajout de granules se fait ensuite par une cavité à l'extrémité de l'appareil. Les granules sont acheminés dans l'enceinte chauffée par une vis tournante. La fluidification se fait graduellement dans la partie chauffée. À l'autre extrémité de l'appareil, le matériel fluidifié peut sortir à travers un embout possédant un diamètre précis selon le diamètre du filament désiré. Le filament se solidifie graduellement en refroidissant après sa sortie.

Le premier critère observable pour un bon filament est l'homogénéité. De plus, il ne doit pas y avoir de particule à l'intérieur ni de bulle. La vitesse de la vis peut être modifiée afin de corriger les imperfections. Ensuite, le filament doit avoir le diamètre précis requis, dans notre cas 1,75 mm. De plus, ce diamètre doit être constant sur toute la longueur du filament, sinon il pourrait se produire un manque de matériel à l'impression ou un blocage de la tête d'impression. Finalement, le filament doit être assez long pour fournir du matériel pour l'impression complète d'une même pièce. Un minimum de 15 cm est d'abord nécessaire pour remplir le module d'impression et un dispositif complet requière au moins 140 cm. Il n'est pas conseillé de changer ou d'ajouter un filament en cours d'impression.

Pour ce projet, deux extrudeurs ont été utilisés. L'extrudeur Filabot pour les thermoplastiques qui se fluidifient facilement comme le P(MMA-EA) et l'extrudeur Brabender® pour les polymères fabriqués en laboratoire.

3.6.1. Extrudeur Filabot

Ce petit extrudeur (*Filabot Original Filament Extruder*) disponible à même le laboratoire a été utilisé dans ce projet pour produire des filaments à partir des granules de P(MMA-EA). Il est muni d'une monovis et il peut atteindre une vitesse maximale de 35 rpm [141].

3.6.2. Extrudeur Brabender®

Un appareil d'extrusion Plastograph de Brabender® est utilisé si la formation de filaments de qualité n'est pas possible avec l'appareil de Filabot. Il s'agit aussi d'un appareil monovis. Par contre, celui-ci est muni de cinq contrôleurs de température tout au long de la vis. Il peut permettre l'extrusion jusqu'à une vitesse de 150 rpm et développer une pression allant jusqu'à 10 000 psi [142], ce qui en fait un appareil plus performant.

3.7. Conception assistée par ordinateur

L'objet à imprimer en 3D doit d'abord être dessiné à l'ordinateur. Plusieurs logiciels de conception permettent de réaliser cette étape. Le logiciel utilisé pour le développement de cette gamme de biocapteurs est FreeCAD, disponible gratuitement. La disponibilité de ce logiciel est un avantage dans un contexte de recherche.

Une fois l'objet créé, celui-ci peut être exporté sous le format .STL (de l'anglais *Standard Tessellation Language*). Ce format de fichier peut être utilisé dans toutes les imprimantes 3D actuellement sur le marché.

3.8. Imprimante 3D

3.8.1. Appareil

L'imprimante utilisée au cours de ce projet pour le développement du biocapteur est le System 30M qui provient de la compagnie Hyrel 3D. Le logiciel contrôlant l'appareil est REPETREL. Cette imprimante peut accueillir quatre modules de déposition de matériel.

La taille maximale des pièces pouvant être fabriquées est de l'ordre de 22,5 cm en longueur (x), 20 cm en largeur (y) et 20 cm en hauteur (z).

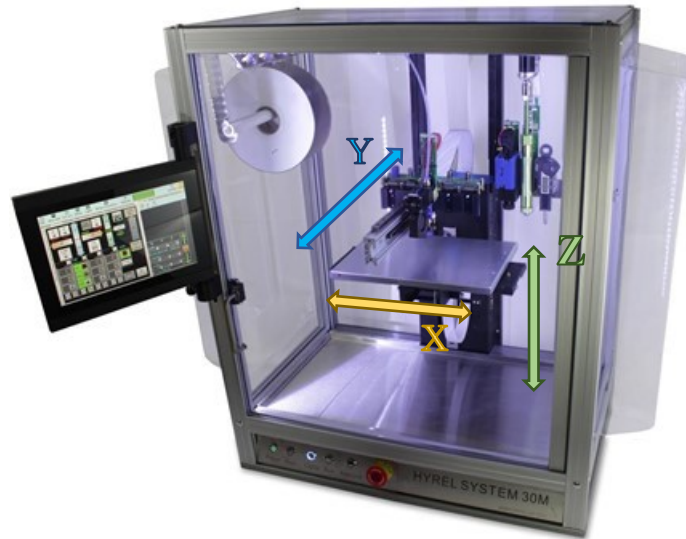


Figure 20. Appareil d'impression 3D HYREL SYSTEM 30M [143]

Pour le présent projet, l'imprimante est utilisée avec les modules chauffés permettant d'imprimer des thermoplastiques. Ces modules sont deux MK1-250 pouvant fonctionner avec des thermoplastiques possédant une température d'impression comprise entre 150°C et 250°C et une MK1-350 pouvant imprimer de 250°C à 410°C.

3.8.2. Définition des paramètres

Afin d'obtenir de bons résultats d'impression 3D, tous les paramètres discutés dans cette section ont été étudiés. Certains des paramètres sont généraux, tandis que d'autres dépendent du thermoplastique utilisé.

Logiciel

Le logiciel pour créer le code d'impression est le Slic3r. Il permet de convertir le dessin fait par ordinateur, en fichier segmenté pour servir de commandes de contrôle au logiciel de l'imprimante 3D, REPETREL. Le logiciel Slic3r décompose donc l'objet en couche d'une épaisseur prédéterminée et chaque couche est décomposée en un chemin d'impression optimisé. Il est aussi possible d'établir plusieurs paramètres comme la température d'impression de chaque couche, la température du plateau d'impression, la vitesse d'impression des diverses parties, l'espacement entre chaque trait du chemin d'impression, la dimension de chacun des traits, le patron d'impression pour les différentes couches, l'accélération des modules d'impression en déplacement, l'orientation de l'objet sur le plateau, la résolution des détails à considérer, le refroidissement des modules d'impression, les parties de l'objet fabriquées respectivement par les différents modules, etc. Tous ces paramètres doivent absolument être optimisés par l'utilisateur afin de permettre le bon déroulement de l'impression et l'obtention d'une pièce de qualité. Un des paramètres est automatiquement contrôlé par le logiciel, c'est la création de parties supplémentaires sur la pièce à imprimer afin de créer du matériel de support. Ce support peut être nécessaire lorsque la pièce contient des parties qui ne seraient ni en contact avec le plateau ni en contact avec une partie déjà imprimée et qui s'imprimeraient donc au-dessus d'un vide.

Optimisation de l'engrenage

Le logiciel REPETREL de l'imprimante 3D utilisée permet de contrôler plusieurs paramètres plus précis pour l'écoulement du thermoplastique à travers le module de déposition. Voici une brève description de ces paramètres :

- **Impulsion par nanolitre (*Pulse/nL*)** : Le nombre d'impulsions que l'engrenage doit faire pour libérer un nanolitre de thermoplastique.
- **Taux d'approvisionnement (*Feed rate*)**: Facteur de correction pour contrôler le volume de thermoplastique.
- **Compression (*Prime*)** : Paramètres pour régler l'approvisionnement du filament par l'engrenage.
- **Nombre d'étapes de compression (*Steps of prime*)** : Le nombre d'impulsions que l'engrenage fait avant de commencer les étapes d'impression.
- **Vitesse des étapes de compression (*Speed step of prime*)** : La vitesse des impulsions effectuées.
- **Temps après la compression (*Time of prime*)** : Le temps de pause, en millisecondes, que le module prend avant de passer à la prochaine étape.
- **Décompression (*Unprime*)** : Paramètres pour régler la rétraction du filament.
- **Nombre d'étapes de décompression (*Steps of unprime*)** : Le nombre d'impulsions que l'engrenage fait dans le sens inverse après une étape d'impression.
- **Vitesse des étapes de décompression (*Speed step of unprime*)** : La vitesse des impulsions effectuées.
- **Temps après la décompression (*Time of unprime*)** : Le temps de pause, en millisecondes, que le module prend avant de passer à la prochaine étape.

Si les paramètres référant à la compression sont beaucoup plus élevés que ceux reliés à la décompression, la pièce aura des surplus de thermoplastique. Dans le cas contraire, la pièce aura des manques de matériel par endroit. Tous ces réglages sont ajustés en fonction du module de déposition avec lequel est associé chaque thermoplastique.

Le module de déposition

Parfois appelé tête d'impression ou extrudeur, ce module est fixé sur une barre horizontale permettant le mouvement de celui-ci dans un des axes latéraux (y). Le haut du module est muni d'un engrenage contrôlé par le logiciel. L'engrenage sert à alimenter le bas du module en filament de thermoplastique. Celui-ci contrôle la quantité, la vitesse, et la force de sortie du thermoplastique. Les équipements utilisés pour ce projet permettent l'impression de filament de 1,75 mm de diamètre. Le bas du module consiste en une enceinte chauffée dont la température est contrôlée par le logiciel. La température d'impression dépend de la capacité du thermoplastique à bien se fluidifier. Elle doit être supérieure à la température de transition vitreuse (T_g) et inférieure à la température de dégradation du thermoplastique, mais elle doit permettre un écoulement régulier sans faire forcer l'engrenage. La pointe du module est située à la suite de l'enceinte chauffée, à l'extrémité inférieure. Elle est constituée d'un cône métallique inversé traversé par une cavité permettant la sortie du thermoplastique fluidifié. Le diamètre de la cavité varie selon les pointes, entre 0,35 mm et 0,50 mm pour les modules utilisés. Le diamètre est déterminant pour la résolution d'impression latérale. De plus, la partie métallique de l'extrémité de la pointe ne doit pas être trop large afin de laisser intacts les filaments déjà déposés en surface. Dans la partie inférieure des modules d'impression se trouve un ventilateur associé à chaque module. Celui-ci est aussi contrôlé par le logiciel. Le ventilateur a comme fonction de refroidir le thermoplastique dès qu'il est déposé. Cette étape est nécessaire pour que le matériel imprimé reste en place. Sans refroidissement, les couches imprimées s'effondrent les unes sur les autres.

L'imprimante 3D utilisée pour le développement permet l'installation de quatre modules d'impression. Les modules peuvent s'alterner automatiquement selon les paramètres du logiciel afin de déposer les différents matériaux sur un même dispositif. Cette diversité augmente les possibilités de conception. Seulement trois d'entre eux sont utilisés pour ce projet.

Surface de déposition

La surface peut aussi être appelée plateau ou lit d'impression. Pour l'imprimante utilisée, le mouvement de la surface permet le contrôle dans l'autre axe latéral (x). La position initiale de la surface par rapport à la pointe d'impression doit être de 0,05 mm afin d'assurer une déposition efficace de la première couche ce qui permettra une meilleure déposition des couches suivantes. Pour l'impression des autres couches, la distance de descente de la surface est contrôlée par le logiciel. Une distance de 0,1 mm est habituellement utilisée lorsqu'il est nécessaire d'obtenir une bonne précision. Ce paramètre contrôle la résolution d'impression obtenue pour l'axe vertical (z).

La surface d'impression utilisée peut être chauffée jusqu'à 95°C afin d'améliorer l'adhésion des premières couches et ainsi assurer l'intégrité de l'impression. La surface peut être en aluminium, en verre traditionnel, en verre silanisé, recouverte de ruban adhésif ou recouverte d'une solution de polymère. Le bon choix des propriétés de la surface assure une impression adéquate des premières couches. Pour ce projet, plusieurs de ces surfaces ont été expérimentées afin de déterminer la plus adéquate.

3.8.3. Détermination des paramètres d'impression

Les paramètres d'impression optimaux doivent être déterminés individuellement pour chaque thermoplastique la première fois qu'ils sont utilisés avec une tête d'impression. Pour les utilisations suivantes, les mêmes paramètres seront simplement sélectionnés. Pour effectuer cette étape, le filament de thermoplastique est introduit dans le module d'impression chauffé de l'imprimante afin de vérifier l'écoulement. La facilité d'impression et la qualité du résultat de celle-ci sont des critères importants pour ce projet. Une température approximative de départ est sélectionnée en se référant à la température de transition vitreuse (T_g). Considérant les différents thermoplastiques commerciaux, la

température d'impression est de 60°C à 150°C plus élevée que la T_g . Pour déterminer la température d'impression, l'écoulement à travers le module d'impression chauffé est d'abord observé au-dessus du vide. Ceci signifie que le module d'impression est éloigné du plateau d'impression et que le thermoplastique s'écoule dans le vide à la sortie de la pointe au bas du module. Un bon écoulement se produit à vitesse constante, avec une conservation de l'apparence initiale du filament de thermoplastique (couleur, transparence, homogénéité), en l'absence de bulle, en l'absence de dégagement de fumée ou de tout autre signe de dégradation. Si ces critères ne sont pas observés, cela pourrait signifier que la température du module d'impression n'est pas optimale. Lorsque l'écoulement observé est adéquat, la température du module d'impression est variée par incréments de plus ou moins 5°C afin de déterminer la plage de température pour l'impression.

Dès que la température d'impression est déterminée, les autres paramètres du logiciel et de l'engrenage doivent être optimisés afin que l'impression réussisse et produise des objets de qualité. La température du plateau d'impression est un paramètre important, car il est possible que certains thermoplastiques adhèrent seulement sur la surface à une température précise. Plusieurs essais sont effectués afin de déterminer les températures du plateau permettant une bonne impression des premières couches.

3.8.4. Impression

Lorsque le dessin par ordinateur a été segmenté, ajouté au logiciel de l'imprimante et que tous les paramètres ont été réglés pour chaque thermoplastique, l'impression du dispositif peut avoir lieu. L'impression est dictée par le code du logiciel. Les composantes suivent les informations d'actions et de déplacement selon le code. Le module d'impression et le plateau se déplacent dans les axes x et y simultanément. L'écoulement d'une quantité précise de thermoplastique fluidifié est contrôlé par l'engrenage. Lorsque tous les mouvements formant la première couche sont complétés, la surface d'impression descend selon l'axe z d'une distance prédéterminée. L'imprimante recommence ensuite les

déplacements requis en x et y pour déposer le thermoplastique constituant la deuxième couche aux bons endroits sur la première couche déjà présente, et ainsi de suite jusqu'à ce que la pièce soit complète. La pièce est ensuite retirée du plateau d'impression et traitée selon les conditions prédéterminées.

Chapitre 4 :

DÉVELOPPEMENT D'UNE SURFACE DE FONCTIONNALISATION

Partie 1 : Fonctionnalisation d'un thermoplastique commercial

La partie 1 de ce chapitre présente les résultats d'une première stratégie pour obtenir la surface de biorecognition et de détection du biocapteur. Il s'agit d'une section interne des canaux du dispositif capable d'être fonctionnalisée par des réactions chimiques et biochimiques. Cette première stratégie consiste à utiliser un thermoplastique commercialement disponible et à en modifier sa surface après l'impression. Le dispositif sera donc adapté à la biodétection une fois qu'il est complètement fabriqué. Les conditions expérimentales essayées pour les différentes étapes de la modification des surfaces sont présentées.

Le thermoplastique choisi est un copolymère de méthacrylate de méthyle et d'acrylate d'éthyle (P(MMA-EA)). Ce copolymère a été sélectionné pour ses propriétés thermomécaniques, de résistance aux milieux aqueux et de transparence aux longueurs d'onde du visible, incluant celles requises pour la détection du fluorophore de 492 à 535 nm.

4.1.1. Préparation des surfaces expérimentales

Des expériences d'hydrolyse ont été réalisées sur trois types de surface constituée de P(MMA-EA) :

Plaquettes commerciales

Les plaquettes commerciales ont été découpées à partir d'une plaque plus grande. Ces plaquettes possèdent un fini de surface plus lisse que celles imprimées.

Plaquettes imprimées

Les plaquettes imprimées ont été fabriquées par l'imprimante 3D à partir d'un filament lui-même précédemment fabriqué à partir de granules. Ces plaquettes possèdent une irrégularité de surface créée par le processus d'impression.

Le filament a été obtenu suite au passage des granules de P(MMA-EA) dans l'extrudeur Filabot. L'extrusion a réussi à produire un filament homogène d'un diamètre variant de 1,71 mm à 1,86 mm selon les mesures prises sur plusieurs sections. De plus, celui-ci possédait une longueur d'environ 8 mètres ce qui permet plusieurs impressions consécutives.

Le filament est ensuite introduit dans le module d'impression chauffé de l'imprimante afin de vérifier l'écoulement (Tableau 5) et de déterminer les paramètres d'impression optimaux (Tableau 6), tel que décrit dans la méthodologie.

Une fois les paramètres optimaux sélectionnés, l'impression du thermoplastique choisi peut avoir lieu. Une pointe d'impression affinée d'un diamètre interne de 0,35 mm est utilisée.

Les plaquettes imprimées possèdent la dimension désirée, mais la surface est irrégulière.

Tableau 5. Observation de l'écoulement du filament de P(MMA-EA).

Paramètres	Observations
Température minimale d'écoulement continu	210°C
Température de dégradation	240°C (Apparition de bulles)
Domaine de travail	210°C à 235°C
Changement de couleur aux températures dans le domaine de travail.	Aucun, reste translucide

Tableau 6. Réglage des paramètres d'impression du P(MMA-EA).

Paramètres	Valeurs
Température du plateau d'impression	80°C
<i>Pulse</i>	0.78 <i>pulse/nL</i>
<i>Feed Rate</i>	1.10 %
<i>Prime</i>	200 <i>steps</i>
	10 000 <i>rate</i>
	70 Ms
<i>Unprime</i>	200 <i>steps</i>
	10 000 <i>rate</i>
	55 Ms

Films minces

Les films minces ont été fabriqués par dépôt centrifuge d'une solution de granules de P(MMA-EA) dans le chlorobenzène sur une lamelle de verre. L'épaisseur des films a été mesurée à l'aide d'un microscope optique en mode interférométrie à balayage vertical. Les épaisseurs varient entre 0,162 μm et 0,344 μm .

4.1.2. Caractérisation du P(MMA-EA)

Transparence

Les résultats d'absorption de la lumière visible par les plaquettes commerciales ont permis de confirmer que le copolymère laisse passer 88% de l'intensité lumineuse pour une épaisseur de 1,5 mm. Les résultats sur les plaquettes imprimées indiquent que celles-ci permettent le passage d'environ 27% du rayonnement. Même si le polymère imprimé présente une transparence, celle-ci demeure faible. L'irrégularité de la surface pourrait causer la diffusion du rayonnement et ainsi une diminution de la transmittance. Des traitements de surface post-impression seront évalués. Ce thermoplastique est tout de même adéquat pour permettre la détection de la fluorescence.

RMN ^1H

Le pourcentage d'acrylate d'éthyle dans les produits a été déterminé par RMN ^1H . Les plaquettes commerciales présentent un ratio de 93% en MMA et de 7% en EA (annexe A). Les granules utilisés pour la fabrication des plaquettes imprimées ont un ratio en MMA de

88% et en EA de 12% (annexe B). Les deux matériaux sont donc constitués en majorité de MMA.

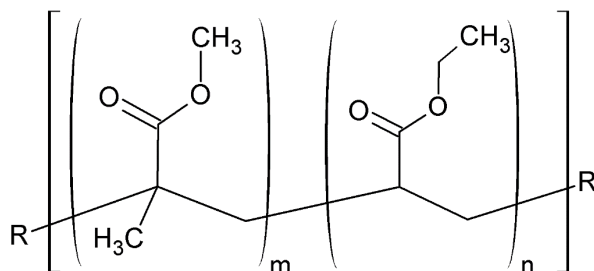


Figure 21. Représentation du copolymère P(MMA-EA). Plaquettes commerciales, $m \approx 93\%$ et $n \approx 7\%$. Granules pour le filament imprimable, $m \approx 88\%$ et $n \approx 12\%$.

4.1.3. Hydrolyse des surfaces

Plusieurs conditions présentées dans le tableau 7 ont été expérimentées. Ces conditions ont été sélectionnées dans l'objectif d'obtenir des groupements d'acide carboxylique en surface, soit par des mécanismes d'hydrolyse connus, soit par des conditions non présentes dans la littérature afin d'étudier aussi l'altération des surfaces par différents produits. Ces expérimentations ont été effectuées sur diverses surfaces du copolymère P(MMA-EA) en s'inspirant de références citées.

Les crochets dans le tableau 7 indiquent les conditions qui ont été expérimentées sur chacune des surfaces. Les conditions d'hydrolyse ont toutes été expérimentées sur au moins une sorte de surface. Les échantillons ont été analysés à l'aide de différentes méthodes afin de corrélérer les résultats entre eux et pour déterminer la condition la plus efficace.

Tableau 7. Conditions d'hydrolyse des surfaces de P(MMA-EA).

Conditions				Plaquettes commerciales	Plaquettes imprimées	Film	Références
H ₂ SO ₄	3 M	60°C	20 min.	√			[116]
	3 M	t.a.	2 h.			√	
	3 M	t.a.	4 h.	√	√	√	
	10 M	t.a.	4 h.	√			[19]
HCl	5 M	t.a.	2 h.			√	
	10 M	t.a.	2 h.	√	√	√	[19]
NaOH	10 M	t.a.	2 h.	√	√	√	[117]
	10 M	t.a.	24 h.	√			
	10 M	t.a.	24 h. ^b	√			[118]
NaOH 1N / MeOH	5 %	t.a.	10 min.	√	√	√	[119]
	5 %	t.a.	4 h.	√			[120]
H ₂ O ₂	35 %	t.a.	2 h.	√	√		-
TFA (dans l'eau)	30 %	t.a.	10 min.		√		[129]

^a t.a. : Température ambiante

^b Surface rincée avec du HCl 1 M au lieu de l'eau habituellement.

4.1.4. Caractérisation des surfaces hydrolysées

4.1.4.1. FTIR-ATR

Toutes les surfaces hydrolysées selon les conditions présentent dans le tableau 7 ont été analysées par FTIR-ATR. Cette technique est utilisée dans le but d'identifier les liaisons présentes à la surface des échantillons. Ainsi, si les conditions expérimentales modifient

les groupements disponibles à la surface, les signaux observés par FTIR-ATR seront modifiés.

Plaquettes commerciales et imprimées

Comme mentionné précédemment, les plaquettes possèdent une surface plus lisse et celles-ci seront analysées plus en détail pour chaque condition réactionnelle au lieu des plaquettes imprimées. Il est donc important de vérifier si les plaquettes possèdent la même réactivité que le filament de thermoplastique utilisé dans le dispositif. Les résultats obtenus par FTIR sont présentés à l'annexe C. Dans certains cas, les conditions n'apportent aucune modification des signaux. Dans d'autres cas, des modifications équivalentes sont visibles sur les signaux des deux surfaces. Par contre, en présence de NaOH seulement, le filament imprimé affiche une plus grande modification du signal que celui de la plaquette. Dans l'éventualité où une condition avec du NaOH est sélectionnée pour la fonctionnalisation, l'impact de la variation aux vibrations présentent vers 2925 cm^{-1} et 2840 cm^{-1} sur le filament devra être étudié. En général, les deux types de surface se comportent de manière similaire face aux conditions réactionnelles. À la suite de ces résultats, il est possible de supposer que l'étape d'extrusion pour former le filament de copolymère ainsi que l'impression en 3D ne modifient pas la réactivité de la surface d'un copolymère de P(MMA-EA).

Lors des expérimentations avec les surfaces de copolymère imprimées, la réaction s'est effectuée selon deux méthodes parallèles. Des échantillons de chaque condition ont été placés sous agitation pendant la durée déterminée et d'autres ont été trempés sans agitation dans les solutions. Les deux méthodes ne montrent pas de différence d'efficacité observable par FTIR-ATR (annexe D). Les différences d'intensité peuvent être attribuables à l'incertitude de cette méthode d'analyse. Cela permet d'extrapoler le phénomène à l'intérieur des canaux du dispositif où une réaction d'hydrolyse pourrait être faite en mode stationnaire ou continu, sans que ceci n'influence l'efficacité de la fonctionnalisation.

Pour toutes les conditions expérimentées, seulement trois présentent des modifications de surface pouvant, à première vue, être attribuables à la formation de groupement acide carboxylique. Pour les échantillons traités avec du H_2SO_4 3 M pendant 4 heures et du NaOH 10 M pendant 2 heures un nouveau signal est présent sur les analyses FTIR-ATR. Un faible signal est présent vers 1685 cm^{-1} correspondants à la vibration d'élongation asymétrique du COO^- [144]. Toutefois, l'intensité relative du signal indique qu'une très faible modification de la surface a lieu. Les échantillons mis en présence d'acide trifluoroacétique ont aussi subi une légère modification dans cette zone. Tel qu'on peut l'observer sur la figure 22 b), un signal supplémentaire est présent vers 1790 cm^{-1} . Par contre, cette modification du signal lors de réaction d'hydrolyse des acrylates n'est pas rapportée dans la littérature. Avec cette même condition, un épaulement est présent autour de 1700 cm^{-1} ce qui pourrait être aussi une représentation de la vibration d'élongation asymétrique du COO^- . En présence de groupement acide carboxylique en surface, il devrait être possible d'observer une vibration étendue autour de 3270 cm^{-1} [144]. Sur la figure 22 a), un faible signal est observable vers 3300 cm^{-1} pour deux conditions, celle avec le H_2SO_4 3 M ayant réagi pendant 4 heures et celle avec le NaOH 10 M ayant réagi pendant 24 heures. Pour ce qui est de l'hydrolyse en condition basique, aucune différence notable n'a été remarquée lors de la comparaison du rinçage à l'eau ou du rinçage avec la solution acide.

Si l'hydrolyse de la surface était pleinement efficace, il serait possible d'observer la vibration marquante du carbonyle de l'acide vers 1710 cm^{-1} ainsi qu'une vibration étendue correspondant au groupement COOH vers 3250 cm^{-1} [144]. Une comparaison est faite sur les images de la figure 23 entre quelques-unes des conditions expérimentées et des surfaces fabriquées à partir de copolymères commerciaux en poudre (*Eudragit*) contenant de l'acide polyméthacrylique (PMAA) à différents pourcentages.

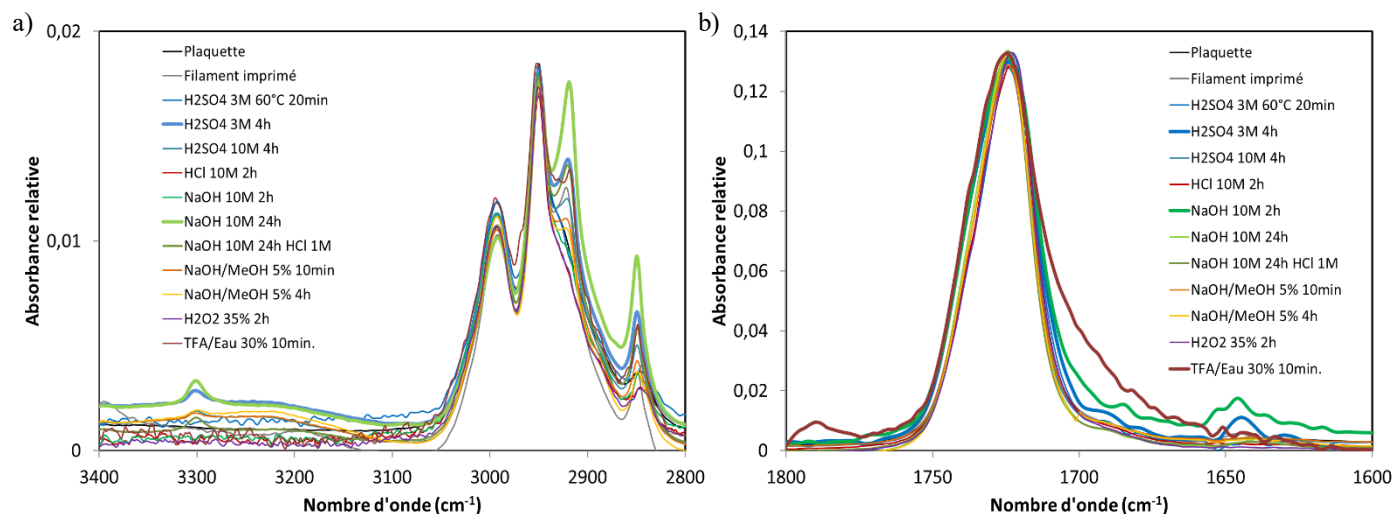


Figure 22. Résultats obtenus par FTIR-ATR pour les différentes conditions expérimentées.

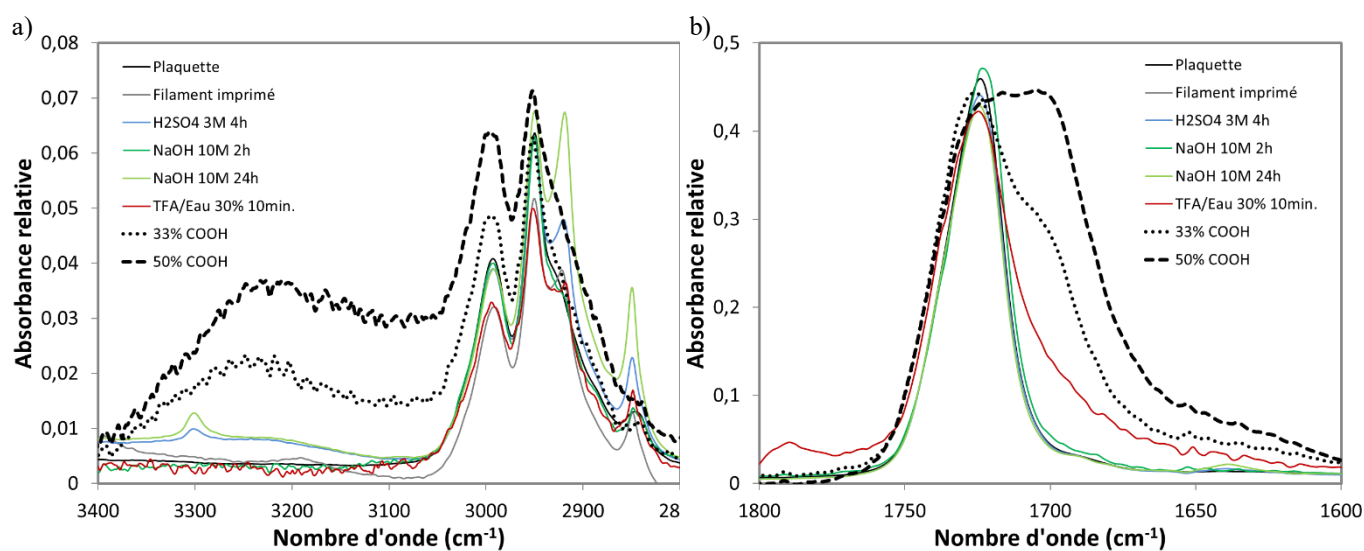


Figure 23. Comparaison des résultats FTIR-ATR entre quelques conditions expérimentales et des copolymères P(MMA-MAA) commerciaux.

Comme les signaux observés avec les surfaces de P(MMA-EA) ne corrélaient pas avec ceux attendus lorsque des groupements acides carboxyliques sont assurément présents, il se pourrait que l'hydrolyse soit seulement réalisée sur une faible partie de la surface. De plus,

les variations observées vers 2925 cm^{-1} et 2830 cm^{-1} sur plusieurs conditions ne sont pas attribuables à la présence d'acide carboxylique. Une autre hypothèse de la faiblesse des signaux significatifs est que le module ATR ne permettrait pas une analyse seulement de la surface modifiée et que le signal de modification soit donc masqué par le signal intense provenant de l'intérieur de l'échantillon. Des films de polymères ont été analysés pour vérifier cette hypothèse.

De plus, il faut préciser que l'utilisation d'un copolymère contenant du PMAA a été envisagée pour le projet. Par contre, celui-ci ne peut pas être imprimé à cause de ses différentes propriétés qui ne sont pas adéquates à un bon thermoplastique imprimable, comme la présence de $-\text{COOH}$ et la T_g .

Film

Le module d'analyse ATR permet une analyse de la surface des échantillons, mais les ondes peuvent pénétrer l'échantillon sur environ $2\text{ }\mu\text{m}$ [135]. Si une modification par l'hydrolyse se produit sur une épaisseur beaucoup plus mince que $2\text{ }\mu\text{m}$, le signal relatif de l'intérieur de l'échantillon sera élevé comparé au signal de la surface modifiée. Il peut s'en suivre une perte de résolution des vibrations à observer. Les films de polymère sont plus minces que les plaquettes. L'épaisseur des films varie entre $0,162\text{ }\mu\text{m}$ et $0,344\text{ }\mu\text{m}$. De ce fait, les résultats obtenus par l'analyse avec le module ATR représenteraient un ratio moins élevé de l'intérieur de l'échantillon.

Les résultats obtenus avec les films ne présentent pas les vibrations attendues pour la présence d'acides carboxyliques. Il n'est donc pas possible d'affirmer à l'aide des résultats obtenus par FTIR-ATR que les conditions d'hydrolyse ont donné de bons résultats.

Résistance du PLA

Afin de déterminer si les conditions sélectionnées conviendront à l'utilisation à l'intérieur du système de biocapteur imprimé, une vérification de la résistance du thermoplastique de PLA a été effectuée. Comme celui-ci constitue le support du dispositif, il ne devra pas subir de modification chimique pouvant interférer avec la fonctionnalisation. De plus, il doit conserver ses propriétés physiques de résistance et il ne doit pas être dissous par les conditions utilisées.

Le PLA ne résiste pas bien à toutes les conditions contenant du NaOH que ce soit en milieu aqueux ou organique. Visuellement, les échantillons de PLA soumis à ces conditions basiques perdent de leur transparence ce qui donne une indication qu'un changement s'est produit. Les analyses FTIR-ATR montrent que des modifications chimiques ont eu lieu en présence de NaOH (annexe E). Parmi les changements observés, le signal à 1753 cm^{-1} originellement présent, correspondant à l'ester dans le polymère, disparaît complètement en condition basique. Une autre modification s'observe pour le signal vers 1086 cm^{-1} correspondant à la vibration asymétrique C-O-C dans l'ester du polymère. Ce dernier se déplace vers les plus hautes fréquences lors de l'hydrolyse [145]. Ces deux modifications du signal sont causées par le bris de l'ester dans la chaîne polymérique pour donner deux terminaisons acides en présence d'eau.

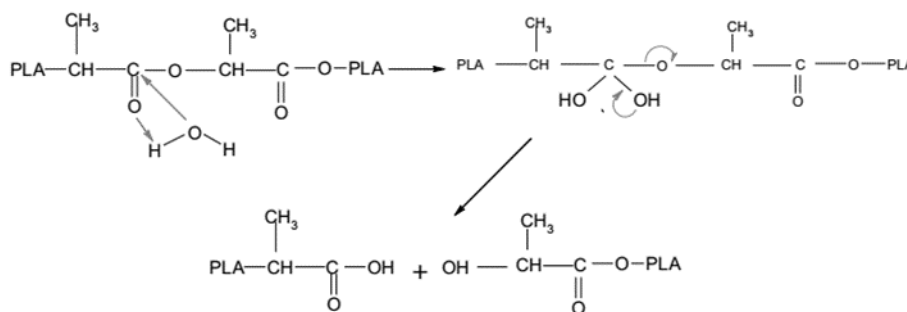


Figure 24. Proposition du mécanisme d'hydrolyse du PLA [146].

Les conditions d'hydrolyses contenant du NaOH ne peuvent donc pas être utilisées, car l'objectif est d'hydrolyser seulement la partie servant à la fonctionnalisation et à la détection. La présence de groupement d'acide carboxylique à plusieurs endroits non contrôlés dans le canal du biocapteur empêcherait d'effectuer les calculs de détection des analytes. Les conditions qui incluent le NaOH ne peuvent donc pas être utilisées pour ce projet.

4.1.4.2. Dosage colorimétrique

Étant donné que les résultats obtenus par FTIR-ATR correspondent à de faibles signaux et ne permettent pas de déterminer quelles sont les meilleures conditions d'analyses, une méthode colorimétrique a aussi été utilisée. Des expériences sont faites sur des plaquettes de copolymère commercial dont la dimension est connue, mais aussi plus constante que celles imprimées.

Tableau 8. Résultats de l'efficacité de l'hydrolyse déterminés par la méthode colorimétrique.

Conditions	Concentration COOH en surface ($\times 10^{-3}$ nmol/mm ²)	Aire occupée par tête polaire (Å ² /COOH)
Nettoyé	3 ± 1	52 ± 23
H ₂ SO ₄ 3M 60°C 20min	7 ± 2	25 ± 6
H ₂ SO ₄ 3M T.a. 4h	4 ± 2	41 ± 19
HCl 10M T.a. 2h	5 ± 1	34 ± 8
NaOH 10 M T.a. 2h	3 ± 1	55 ± 26
NaOH/MeOH 5% T.a. 10min.	2,3 ± 0,5	72 ± 17
H ₂ O ₂ 35% T.a. 2h	5 ± 3	34 ± 18

Les résultats sont reportés en concentration par surface et en fonction de l'aire occupée par chaque tête polaire. Selon cette méthode d'analyse, la condition d'hydrolyse ayant la plus

grande quantité d'acide carboxylique est celle avec l'acide sulfurique à une concentration de 3 M chauffée à 60°C pendant 20 minutes. Si la quantité de moles de TBO recueillie sur la surface pendant l'analyse représente la quantité de moles d'acide carboxylique disponible en surface, la concentration en acide carboxylique pour cette condition est de 7×10^{-3} nmol/mm². La représentation de l'aire occupée par chaque tête indique si celles-ci sont espacées ou rapprochées les unes des autres. Selon le rayon d'un acide carboxylique variant de 2,75 à 2,95 Å [147], l'aire occupée par une molécule d'acide carboxylique peut varier approximativement entre 23,8 et 27,3 Å². Le résultat de 25 Å² pour l'acide sulfurique à 60°C pourrait donc indiquer qu'une monocouche d'acide carboxylique est présente en surface, si les approximations de surface et de réactivité sont exactes.

Les résultats présentent une grande variance. Ceci peut être dû aux approximations établies, dans un premier temps, sur la planéité et la régularité parfaites des surfaces. Dans un second temps, une autre approximation établit un taux de couplage à 100%, ce qui signifie que la totalité des groupements d'acide carboxylique sera couplée à une molécule de TBO durant la réaction, que la totalité des molécules de TBO sera recueillie après la réaction et que la totalité des molécules de TBO provient de liaisons avec des groupements d'acide carboxylique. Néanmoins, ces résultats permettent de distinguer quelles conditions semblent meilleures pour obtenir des acides carboxyliques.

4.1.4.3. Angle de contact

Il est vrai que la présence d'acide carboxylique peut rendre une surface plus hydrophile [19]. Par contre, les résultats de mesures d'angle de contact ne peuvent pas être directement corrélés à la présence de groupement COOH (annexe F). Les autres groupements polaires peuvent aussi rendre une surface plus hydrophile. Le rinçage peut être un autre facteur qui affecte l'angle de contact [136]. Cette méthode ne permet pas de déterminer la meilleure condition d'hydrolyse dans ce cas.

4.1.4.4. XPS

Afin d'établir avec plus de certitude la nature de la surface hydrolysée, un appareil de spectroscopie des photoélectrons rayon X a été utilisé. Cette technique est plus précise que le FTIR-ATR et elle permet d'obtenir des résultats correspondant à une plus fine épaisseur de la surface des échantillons.

Une plaquette de P(MMA-EA) commerciale originale et une autre hydrolysée selon les conditions d'acide sulfurique 3 M chauffée à 60°C pendant 20 minutes ont été analysées. La technique XPS permet d'obtenir de l'information sur l'état des éléments et la nature des liaisons chimiques présentes en surface [140]. Les résultats sont rapportés en fonction de l'intensité de présence d'orbitale atomique d'énergie spécifique. La comparaison avec l'échantillon avant et après l'hydrolyse acide indique une légère modification (Tableau 9). L'orbitale 1s de l'oxygène a été analysée en haute résolution afin d'effectuer la déconvolution du signal en fonction de chacun des états des atomes d'oxygène présents. Cette analyse permet d'observer la quantité d'oxygène provenant de deux modes de liaison. Dans un premier temps, la liaison R-O vers 533,78 eV est reliée à la présence des esters de méthyle et d'éthyle. Ensuite, la liaison C=O vers 532,21 eV peut être causée à la fois par les esters et par les acides carboxyliques. Une surface de polymère acrylate possède normalement un ratio équivalent à 1 pour la présence de ces deux signaux, car les liaisons représentées proviennent des mêmes groupements fonctionnels, soit les esters [140, 148]. L'échantillon témoin n'ayant subi aucune modification possède un ratio du pourcentage atomique O-R / C=O de 1,23. Ce qui est plus élevé que ce qui est attendu. L'échantillon hydrolysé en milieu acide analysé possède un ratio de 0,91 ce qui signifie que la présence de liaison O-R a diminué en comparaison à la présence de liaison C=O. Cette diminution peut être associée à la modification d'une certaine quantité de groupements ester en groupements acide carboxylique.

Tableau 9. Résultats obtenus par XPS pour l'hydrolyse de plaquettes de P(MMA-EA).

Plaquettes originales			Plaquettes après condition d'hydrolyse	
Orbitale	Énergie de liaison (eV)	% atomique	Énergie de liaison (eV)	% atomique
O 1s R-O	533,78	13,44	533,84	7,47
O 1s C=O	532,21	10,9	532,34	8,2
Ratio				
(O 1s R-O) / (O 1s C=O)	-	1,23	-	0,91

Cette technique permet d'obtenir de l'information provenant essentiellement de la surface d'un solide. L'information provient d'une épaisseur d'environ 0,5 à 10 nanomètres en surface. L'intensité du signal provenant de l'intérieur de l'échantillon est donc moins grande que par la technique FTIR-ATR. Néanmoins, les résultats n'indiquent pas que la surface complète des échantillons a été modifiée.

4.1.5. Condition d'hydrolyse optimale pour le projet

L'objectif de l'hydrolyse était d'obtenir la plus grande quantité possible de groupement acide carboxylique à la surface tout en choisissant une condition utilisable dans un biocapteur imprimé en 3D. Les conditions en présence de NaOH ne peuvent pas être applicables à ce dispositif, car le PLA qui est le thermoplastique constituant le support ne résiste pas à ces conditions. Les analyses par FTIR-ATR ne permettent pas d'établir avec certitude laquelle des autres conditions est la plus appropriée. L'analyse colorimétrique classe la condition d'acide sulfurique 3 M chauffée à 60°C pendant 20 minutes comme étant celle qui permet d'obtenir le plus d'acide carboxylique en surface. Les analyses par

la technique XPS viennent confirmer qu'une modification à la surface a eu lieu. Cette condition d'hydrolyse sera donc utilisée après les étapes d'impression 3D afin de préparer la surface pour la fonctionnalisation. De plus, tel qu'il a été discuté, les différentes étapes de fonctionnalisation peuvent se faire en débit continu ou sous agitation.

4.1.6. Fonctionnalisation biologique

Pour s'assurer de la viabilité de la séquence de fonctionnalisation de la surface par des anticorps de microcystine-LR, les étapes sont d'abord suivies en utilisant l'immunoglobuline G et l'anti-immunoglobuline G étiqueté avec le fluorophore FITC. Cette méthode permet de vérifier la réactivité de la surface hydrolysée. La condition de H_2SO_4 à 60°C a donc été sélectionnée pour effectuer les étapes subséquentes de la fonctionnalisation. Plusieurs surfaces de plaquettes commerciales de P(MMA-EA) ont été traitées par cette condition et utilisées dans les étapes suivantes telles qu'elles sont décrites dans la méthodologie.

4.1.6.1. Activation

FTIR-ATR

Si cette étape avait eu un bon rendement, la présence de NHS à la surface de l'échantillon aurait causé une diminution du signal d'acide carboxylique et l'apparition d'un signal correspondant à un amide tertiaire vers 1650cm^{-1} . Toutefois, aucun de ces deux phénomènes n'est observé (annexe G).

XPS

Une analyse des échantillons activés au XPS en mode survol permet de comparer le signal d'intensité de l'orbital 1s de l'azote. Sur les échantillons hydrolysés précédemment, il ne devrait pas y avoir d'azote, tandis que sur les échantillons de cette étape-ci, la présence de NHS en surface devrait occasionner une apparition du signal N_{1s}.

Dans le tableau 10, il est possible de constater que les résultats pour l'azote ne correspondent pas à ce qui est attendu. Bien que l'échantillon original ne montre pas une présence d'azote détectable, la valeur obtenue pour l'échantillon activé avec le NHS n'est pas la plus grande. Une hypothèse de la forte concentration en azote sur l'échantillon hydrolysé est qu'il y a eu une contamination au niveau de cet échantillon. De plus, la molécule de NHS possède des liaisons carbonyles différentes des carboxyles et qui ressemblent plus à l'énergie de liaison des lactames, ce qui correspond bien à l'orbital C_{1s} C=O de l'analyse haute résolution qui est seulement détectable pour l'échantillon activé. Cette étape de la fonctionnalisation a donc fonctionné, mais elle ne s'est pas effectuée avec un très bon rendement. La séquence de fonctionnalisation biologique a tout de même été poursuivie.

Tableau 10. Résultats obtenus par XPS pour l'activation de plaquettes de P(MMA-EA).

Orbitale	Énergie de liaison (eV)	Pourcentage atomique (%)		
		Original	Hydrolysé	Activé
N _{1s}	400	N.D.	1.25	0.93
C _{1s} C=O	288	N.D.	N.D.	1.13

N.D. : Non détectable

4.1.6.2. Liaisons biorécepteurs IgG

FTIR-ATR

Il semble y avoir une très faible augmentation du signal vers 1650 cm^{-1} ce qui correspond aux différentes assignations de pics prévus [149] (annexe G). Par contre, l'augmentation n'est pas significative et les différentes vibrations dans cette région de l'amide I ne peuvent être distinguées.

Il est possible de constater une légère augmentation à 3296 cm^{-1} , correspondant habituellement à l'élongation du lien C-N surtout retrouvée dans les protéines [150]. Dans ce cas-ci également, l'augmentation du signal n'est pas significative.

XPS

On remarque dans le tableau 11 que l'analyse permet de détecter des atomes de soufre et une plus grande quantité d'azote. Cela confirme la présence de l'anticorps IgG à la surface de l'échantillon. Il est de même possible de constater une modification marquée du ratio des différentes orbitales O_{1s} causé par les multiples liaisons entre carbone et oxygène existantes dans la protéine. Normalement, un nouveau signal vers 287,5 eV dans l'analyse haute résolution du C_{1s} devrait être visible, celui-ci correspondant aux liaisons NH-CHR-CO et $-C(C=O)-NH_2$ caractéristiques des protéines [149]. Par contre, ce dernier signal n'est pas observé dans les résultats obtenus. Une autre méthode de déconvolution pour les résultats de l'analyse haute résolution du C_{1s} pourrait permettre d'identifier ce signal.

Tableau 11. Résultats obtenus par XPS pour la liaison IgG sur les plaquettes de P(MMA-EA).

Orbitale	Énergie de liaison (eV)	Pourcentage atomique (%)			
		Original	Hydrolysé	Activé	IgG
N_{1s}	400	N.D.	1,25	0,93	4,48
S_{2p}	164	N.D.	N.D.	N.D.	0,25
C_{1s} C=O	288	N.D.	N.D.	1,13	4,36
O_{1s} R-O	534	13,44	7,47	6,34	2,88
O_{1s} C=O	532	10,9	8,2	8,24	7,63
Ration O_{1s} R-O/C=O		1,23	0,91	0,77	0,38

N.D. : Non détectable

Dans certains cas, les protéines IgG pourraient être adsorbées à la surface sans liaison covalente. Cette adsorption non spécifique sera vérifiée par les analyses de la partie 2 de ce chapitre. Étant donné que les résultats indiquent la présence de la protéine sur la surface, la réaction suivante est effectuée.

4.1.6.3. Liaison d'affinité IgG

FTIR-ATR

La présence de l'anticorps et du fluorophore des échantillons devrait causer une augmentation de tous les signaux prévus pour la présence d'amides en plus de l'apparition d'un signal correspondant au groupe R-N=C=S entre 2140 et 2040 cm⁻¹. Par contre, la

présence de celui-ci ne peut être confirmée par les résultats obtenus au FTIR-ATR (annexe G).

XPS

Les pourcentages atomiques en soufre et en azote ont subi une augmentation notable. Cela est expliqué par la deuxième couche d'anticorps présente en surface et par la présence de la molécule de fluorophore possédant du soufre et de l'azote.

Tableau 12. Résultats obtenus par XPS pour l'affinité biologique sur le P(MMA-EA).

Orbitale	Énergie de liaison (eV)	Pourcentage atomique (%)				
		Original	Hydrolysé	Activé	IgG	Anti-IgG FITC
N _{1s}	400	N.D.	1,25	0,93	4,48	8,47
S _{2p}	164	N.D.	N.D.	N.D.	0,25	0,33

N.D. : Non détectable

Il est donc possible de constater que la fonctionnalisation s'est produite. Par contre, le pourcentage d'efficacité sommaire de fonctionnalisation à la surface est difficilement interprétable dû à la présence d'une multitude de liaisons d'énergie similaire.

Stéréomicroscope en épifluorescence

Les images de la figure 25 ont été obtenues avec un stéréomicroscope en mode épifluorescence. Une première observation permet de faire le décompte sommaire de la quantité de zones fluorescentes indiquant la présence du fluorophore.

Les images représentent des photos prises sur trois échantillons. Sur ces photos, seulement une partie de la surface du P(MMA-EA) est visible. Afin de mieux évaluer la fonctionnalisation de l'entière de l'échantillon, plusieurs sections de la surface ont été observées sous le microscope et la superficie des zones fluorescentes a été rapportée en fonction de la surface totale. Les analyses d'images permettent d'obtenir un pourcentage de surface fluorescente, donc un pourcentage équivalent de surface fonctionnalisée. Les échantillons de la séquence de réaction complète possèdent une surface fonctionnalisée à 0,07 % avec un écart type de 0,21%. L'efficacité de la séquence de réaction est donc très faible et variable.

Un facteur pouvant influencer la réussite de la dernière étape d'interaction biologique d'affinité est l'orientation de l'anticorps IgG à l'étape précédente. La liaison de l'IgG avec la surface se fait par un groupement amine sur la protéine. Or, la protéine possède plusieurs groupements amines disponibles pour réagir qui ne sont pas tous situés à l'extrémité désirée des chaînes lourdes. La quantité de protéines liées de manière à être actives représente donc une probabilité de réaction. Néanmoins, cette réaction peut être contrôlée par différents facteurs, entre autres, en présence d'une autre protéine comme la protéine G, pouvant orienter l'anticorps [106].

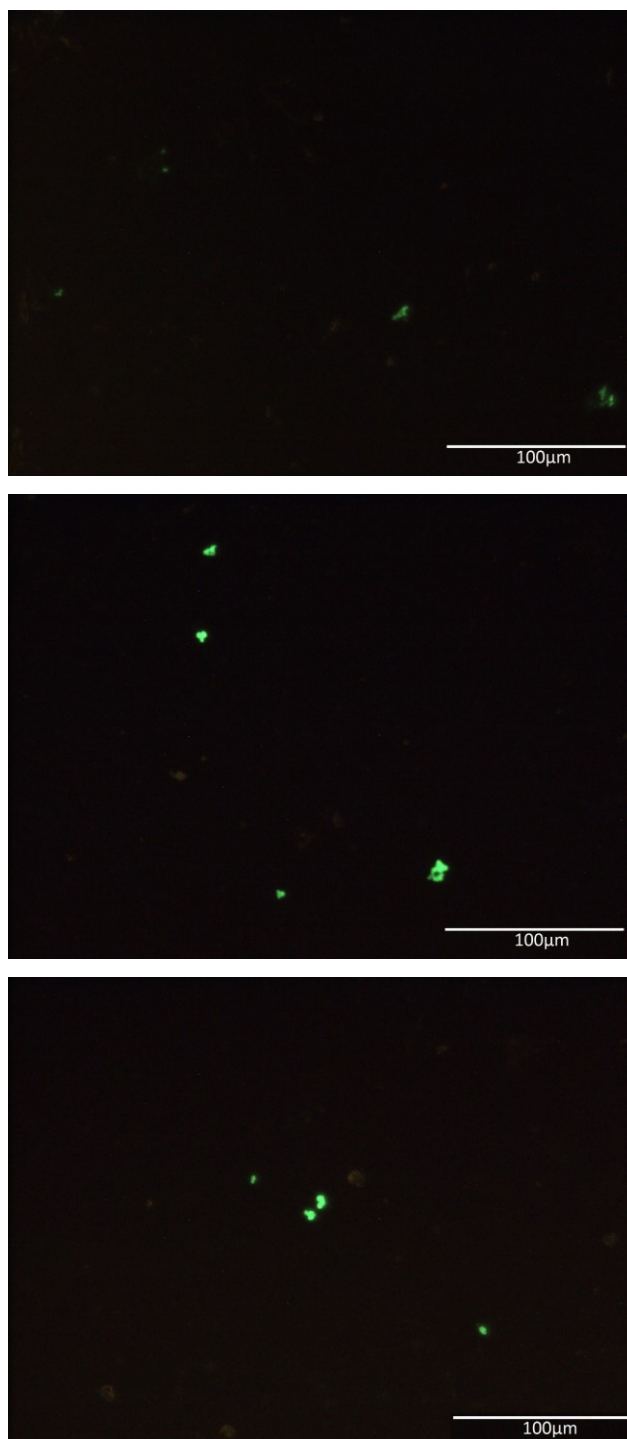


Figure 25. Photos du stéréomicroscope en épifluorescence des plaquettes de P(MMA-EA) après la réaction d'affinité. Objectif 20X.

4.1.7. Sommaire de la Partie 1

L'objectif de cette partie était d'obtenir une surface pouvant être fonctionnalisée à partir d'un thermoplastique imprimable disponible commercialement. Une fonctionnalisation d'anticorps est possible sur des acides carboxyliques. Cependant, les thermoplastiques possédant ces groupements ne sont pas imprimables. Il existe toutefois des thermoplastiques acrylates imprimables pouvant être hydrolysés afin d'obtenir le bon groupement fonctionnel pour lier des protéines de façon covalente. Plusieurs conditions d'hydrolyses ont été essayées sur des surfaces de P(MMA-EA). Par contre, les analyses par FTIR-ATR, par XPS et par colorimétrie effectuées ne permettent pas de déterminer avec certitude l'efficacité de l'hydrolyse. Une des conditions semble toutefois être plus prometteuse, celle avec de l'acide sulfurique 3M chauffée à 60°C. Cette dernière condition a donc été utilisée afin d'expérimenter le reste de la séquence de biofonctionnalisation. En somme, l'aire de la surface ayant réagi correctement à toutes les étapes de la séquence représente seulement 0,07 %. Les raisons pouvant expliquer ce résultat sont multiples, car chaque étape de la séquence pourrait être optimisée. Cependant, le manque d'efficacité de l'hydrolyse du P(MMA-EA) dans les conditions utilisées semble demeurer le facteur limitant. Pour cette raison, une autre stratégie est présentée dans la deuxième partie de ce chapitre.

Partie 2 : Développement d'un copolymère thermoplastique

Dans la partie précédente du chapitre, il a été démontré que l'utilisation d'un copolymère d'acrylique commerciale n'est pas adéquate pour la fonctionnalisation dans un biocapteur. En effet, l'hydrolyse des esters du P(MMA-EA) ne permet pas d'obtenir une grande quantité de groupements d'acide carboxylique en surface afin de réaliser une fonctionnalisation efficace et complète sur toute la surface. Un copolymère peut donc être développé et fabriqué en laboratoire afin de répondre à tous les critères nécessaires à l'utilisation voulue comme surface de détection dans un dispositif imprimé.

4.2.1. Polymérisation

La polymérisation du P(MMA-EA-*t*BuAcr) a été effectuée selon la méthodologie décrite. Un suivi de la réaction a été effectué après 8 heures. Le rendement obtenu est de 92%.

4.2.2. Analyses de caractérisation

4.2.2.1. FTIR-ATR

Étant donné la ressemblance du copolymère à celui de P(MMA-EA) étudié dans la partie 1, les spectres ont été comparés (annexe H). Le signal dans la région du carbonyle présente une différence. Un signal est présent à 1724 cm^{-1} , mais un épaulement est observable vers 1715 cm^{-1} pouvant être relié à la vibration différente du carbonyle associé au *tert*-butyle. De plus, un signal supplémentaire est présent vers 1364 cm^{-1} attribuable à la déformation symétrique des groupements CH_3 du *tert*-butyle [151]. Les résultats correspondent au copolymère attendu.

4.2.2.2. RMN 1H

L'analyse du spectre RMN (annexe I) permet de constater que le bon copolymère a été produit. L'assignation des différents protons permet aussi de déterminer la quantité de chaque motif constituant le polymère. Celui-ci possède 72,8% de MMA, 17,9% de EA et 9,3% de tBuAcr.

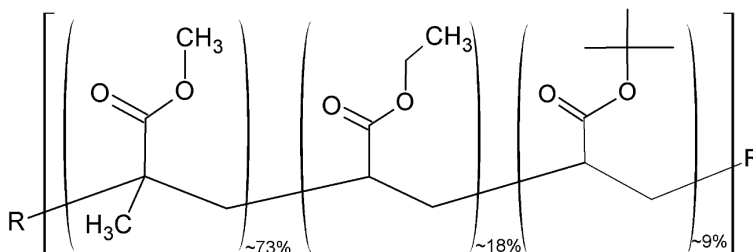


Figure 26. Représentation du copolymère de P(MMA-EA-tBuAcr).

4.2.2.3. Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

L'analyse de calorimétrie différentielle à balayage a été effectuée de 20°C à 180°C sur l'échantillon de copolymère. La température de transition vitreuse se situe à 103,00°C. Selon les propriétés requises, cette température est adéquate, car elle est beaucoup plus basse que la température maximale d'utilisation des modules d'impression chauffés de 250°C.

4.2.2.4. Chromatographie de perméation de gel (GPC)

La masse moléculaire moyenne en masse (M_w) du copolymère a été déterminée par chromatographie de perméation de gel. Le résultat obtenu est de 253 000 g/mol. Dans les

critères établis dans la méthodologie, il a été mentionné que la M_w pour le PMMA devrait être inférieur à 100 000 g/mol afin d'atteindre une bonne fluidité avec l'augmentation de la température. La structure du copolymère synthétisé se compose d'environ 73% du même monomère que le PMMA. Il est donc possible que la masse molaire nécessaire pour atteindre une bonne fluidité soit similaire. Des essais de fluidification sont tout de même être effectués.

4.2.2.5. Analyses de fluidification

Un échantillon du copolymère synthétisé et un autre du copolymère commercial ont été analysés en parallèle. Comme ce dernier possède de bonnes propriétés de fluidification pour l'impression 3D, ces résultats seront comparés à ceux du copolymère synthétisé.

Presse chauffée

Les essais effectués sur le P(MMA-EA-tBuAcr) permettent de déterminer qu'une température de 125°C pendant 5 minutes est requise pour former une pastille uniforme. En comparaison, à cette température, le P(MMA-EA) n'a besoin que d'une minute pour se fluidifier et former une pastille uniforme. Le copolymère synthétisé pourrait donc ne pas se fluidifier assez rapidement à l'intérieur d'un module d'impression 3D.

De plus, à une température de 200°C pendant 10 minutes une légère dégradation du P(MMA-EA-tBuAcr) commence à être observée, car des bulles sont présentes dans la pastille. La dégradation s'explique par la modification du groupement *tert*-butyle. Avec la température, il se produit une élimination d'une molécule d'isobutylène pour laisser un groupement d'acide carboxylique sur le copolymère. Il est important de déterminer le temps maximal avant que la dégradation ne se produise, car lors des travaux avec une

imprimante 3D, il est possible que le filament de thermoplastique réside un long moment à l'intérieur du module de déposition chauffé. Dans ce cas, le thermoplastique ne doit pas montrer d'altération et il doit rester intact en vue de la prochaine impression.

Suite à ces résultats, il est possible de déterminer un domaine de température d'impression préliminaire qui est de 125°C à 200°C et un temps de résidence inférieur à 10 minutes.

Fluidification sans pression

Lors de l'utilisation des thermoplastiques dans une imprimante 3D, les filaments ne subissent pas une forte pression pour se fluidifier et s'écouler hors du module de déposition. Il est donc important de vérifier la fluidité sans l'application de pression sur l'échantillon. Un échantillon du copolymère commercial a été observé comme référence sous les mêmes conditions afin de déterminer la qualité de la fluidification nécessaire à un fonctionnement adéquat pour l'impression 3D.

La fluidification pour le copolymère de référence débute vers une température programmée de 135°C et elle est complète vers 260°C. Pour le thermoplastique P(MMA-EA-tBuAcr) la fluidification débute vers 260°C et elle est complète vers 320°C. La fluidification requiert donc plus de chaleur pour le nouveau copolymère. De plus, les observations visuelles permettent de constater qu'avec le thermoplastique synthétisé, des bulles sont produites en même temps que la fluidification. Il se pourrait donc qu'une dégradation s'observe à la température de fluidification efficace.

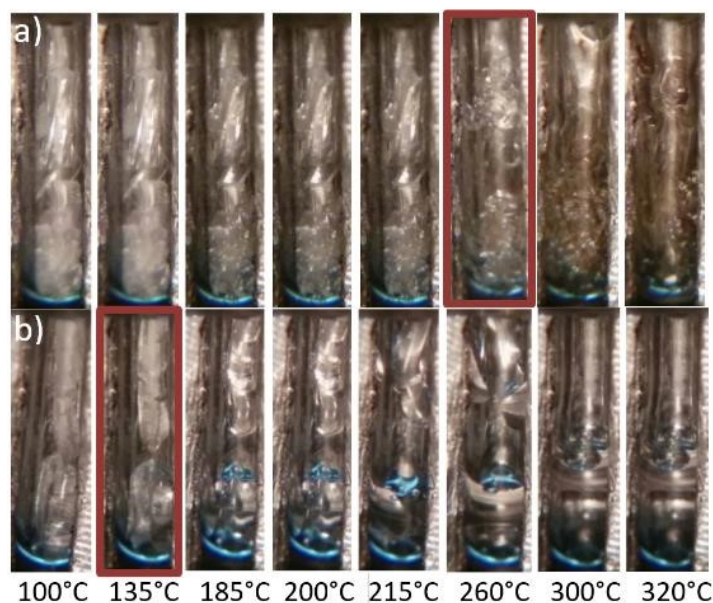


Figure 27. Fluidification sans pression selon la température pour les thermoplastiques a) P(MMA-EA-tBuAcr) et b) P(MMA-EA)

4.2.3. Traitement acide

Le traitement est effectué avec l'acide trifluoroacétique (TFA). Celui-ci a d'abord été sélectionné pour son efficacité à modifier le groupement ester de *tert*-butyle en groupement acide carboxylique. Au final, la solution d'hydrolyse (30% TFA dans l'eau) devra passer dans les canaux du dispositif imprimé afin de créer des groupements COOH sur la surface interne de la composante d'analyse. Des expérimentations sont d'abord effectuées sur des petites surfaces de P(MMA-EA-tBuAcr). Une exposition de 2 minutes montre qu'une transformation s'est produite. Une exposition de 10 minutes présente un plus grand ratio de transformation. Au-delà de 10 minutes, les surfaces commencent à perdre leur intégrité et la surface devient opaque.

Analyses FTIR-ATR

Les résultats sont comparés aux plaquettes non hydrolysées (annexe J). Les échantillons hydrolysés possèdent un signal intense à 1709 cm^{-1} correspondant à la vibration du carbonyle dans un acide carboxylique [151]. Le signal du copolymère commercial hydrolysé de la partie 1 est aussi comparé aux présents résultats. Il est possible de conclure une fois de plus que les expérimentations de la partie 1 ne permettent pas d'obtenir une quantité d'acide carboxylique aussi grande qu'avec le thermoplastique polymérisé en laboratoire.

Transparence

La transparence du nouveau copolymère synthétisé a été analysée pour les surfaces fabriquées préalablement d'une épaisseur approximative 1 mm. Le pourcentage de transmittance pour la plage de longueur d'onde de 492 nm à 535 nm varie de 71% à 90% selon l'épaisseur des plaques. La transparence du polymère hydrolysé a aussi été déterminée. Le pourcentage de transmittance pour la plage de longueur d'onde de 492 nm à 535 nm varie de 63% à 91% selon l'épaisseur des plaquettes. La transparence n'est donc pas altérée de façon significative par l'hydrolyse. Le nouveau copolymère offre donc une transparence adéquate pour effectuer des analyses de fluorescence dans un dispositif biocapteur.

4.2.4. Biofonctionnalisation

Les réactions pour l'immunoglobuline G présentées dans la méthodologie et expérimentées avec les plaquettes commerciales sont reproduites sur les échantillons du nouveau

copolymère P(MMA-EA-tBuA) hydrolysé. Les résultats présentés sont ceux obtenus avec le stéréomicroscope en mode épifluorescence, car c'est cette technique qui permet de mieux visualiser l'efficacité des réactions. De plus, celle-ci représente le type de caractérisation optique prévu avec le dispositif final.

Stéréomicroscope en épifluorescence

Trois échantillons fonctionnalisés ont été analysés. Quatre photos ont été prises à un grossissement de 5 fois sur chacun des trois échantillons afin d'obtenir une représentation d'une plus grande partie de la surface. Des essais ont été réalisés avec la séquence complète de biofonctionnalisation prévue, mais aussi selon différentes séquences sans hydrolyse ou sans activation afin d'observer l'importance de chaque étape et l'effet d'adsorption non spécifique.

Les photos de la figure 28 représentent la réaction sans acidification. Celle-ci fonctionne mieux selon les premiers résultats. Cela pourrait être causé par le caractère hydrophobe différent de la surface avec t-Bu de celle hydrolysée. La surface non hydrolysée, celle qui possède encore les groupements t-butyle, obtient 2,5 % plus d'adsorption non spécifique pour le composé IgG. La surface hydrolysée possède 0,1 % plus d'adsorption non spécifique pour le composé anti-IgG-FITC. En somme l'adsorption non spécifique des protéines est plus élevée sur une surface hydrophobe que sur la surface hydrophile hydrolysée, car les protéines s'adsorbent par interaction hydrophobe. Néanmoins, toutes les mesures effectuées possèdent un écart type très élevé. Ceci est causé par l'irrégularité des résultats pour un même type de surface. Afin d'obtenir des résultats plus précis, plus de trois échantillons par essais devraient être analysés.

Pour pallier l'absorption non spécifique dans les développements ultérieurs, de l'albumine de sérum bovin (BSA) peut-être ajouté après la fonctionnalisation afin de bloquer les différents sites d'adsorption non spécifique [152].

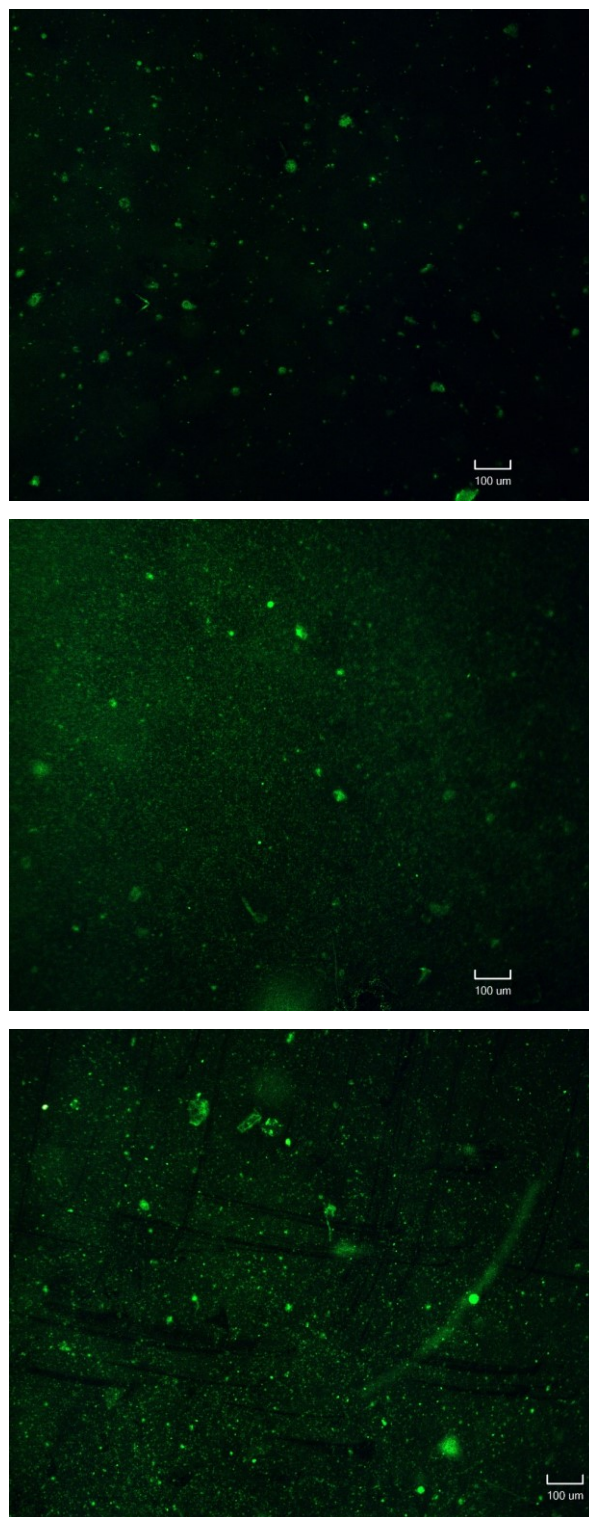


Figure 28. Photos du stéréomicroscope en épifluorescence de trois plaquettes de P(MMA-EA-tBuAcr) après la biofonctionnalisation sans hydrolyse. Objectif 5X.

Tableau 13. Résultats de la fonctionnalisation sur les surfaces de P(MMA-EA-tBuAcr)

P(MMA-EA-tBuAcr)	Pourcentage de la surface fonctionnalisée (%)
Séquence complète	1 ± 2
Séquence sans hydrolyse	8 ± 6

Tableau 14. Résultats de l'adsorption non spécifique des composés biologiques sur les surfaces de P(MMA-EA-tBuAcr)

P(MMA-EA-tBuAcr)	Adsorption non spécifique (% surface)	
	IgG	Anti-IgG FITC
Original	3 ± 7	0,10 ± 0,02
Hydrolysé	0,5 ± 0,5	0,2 ± 0,1
Activé	-	0,4 ± 0,2

4.2.5. Extrusion

Le copolymère thermoplastique obtenu de façon expérimentale se retrouve sous forme de poudre. Pour être utilisé avec l'imprimante 3D, celui-ci doit être mis en filament par un extrudeur. Le même extrudeur que dans la partie 1 est d'abord utilisé (*Filabot*). Par contre, celui-ci ne permet pas de former un filament. La poudre du copolymère reste collée à la vis. Le thermoplastique de P(MMA-EA-tBuAcr) en poudre est donc solubilisé dans l'acétone, étendu sur une plaque à cuisson et séché afin de former une feuille de copolymère. Cette feuille est découpée en morceaux de taille adéquate pour l'extrudeur.

L'extrusion est alors possible, mais le filament résultant n'est pas homogène. L'extrudeur disponible au laboratoire ne permet pas de créer une pression à la sortie de manière à obtenir un débit de filament constant.

Les morceaux de thermoplastique sont donc extrudés par un l'appareil Brabender®. Un filament homogène est obtenu. Par contre, celui-ci possède un diamètre plus petit que 1,75mm et très irrégulier sur toute la longueur. L'impression de celui-ci est tout de même tentée.

4.2.6. Impression

Avant de débiter l'impression, certains paramètres du module de dépositions doivent être ajustés. La première étape consiste à ajuster la température à l'intérieur du module, afin d'assurer une bonne fluidité. Le tableau 15 représente le comportement du copolymère P(MMA-EA-tBuAcr) selon la température.

Le filament du copolymère ne s'écoule pas adéquatement avec l'imprimante utilisée pour ce projet. Lorsque la température est assez élevée pour permettre au matériel d'être fluide, la présence de bulles liées à la dégradation est observée. Lorsque la température du module d'impression est diminuée avant le point de dégradation, les engrenages du module ne sont pas assez forts pour que l'écoulement se produise. Le thermoplastique doit être poussé manuellement pour qu'un écoulement se produise. Le matériel est donc trop visqueux pour l'équipement lorsqu'il est à sa température optimale.

Tableau 15. Détermination de la température d'impression du filament de P(MMA-EA-tBuAcr).

Température du module de déposition	Observations		
	Écoulement	État	Notes
210°C	Rapide	Blanchis, présence de bulles	Crépitement lié à la forte dégradation.
200°C	Rapide	Blanchis, présence de bulles	Crépitement lié à la forte dégradation.
190°C	Moyen	Blanchis, présence de bulles	
180°C	Lent	Blanchis, présence de bulles	
170°C	Très lent	Blanchis, présence de bulles	Lorsque le filament est poussé manuellement, quelques sections sont translucides (sans dégradation).
160°C	Aucun		Lorsque le filament est poussé manuellement, un écoulement très lent est observable.

4.2.7. Sommaire de la partie 2

La technique de polymérisation en émulsion est une bonne méthode pour fabriquer des copolymères d'acrylique. Le pourcentage de chaque motif est associé aux quantités de monomères initiales, ce qui permet de bien contrôler le résultat souhaité. La présence du groupement ester de tert-butyle dans le P(MMA-EA-tBuAcr) permet d'obtenir une fonctionnalisation de la surface de 8%, et ce même sans l'étape d'hydrolyse. Par comparaison, le P(MMA-EA) commercial de la partie 1 permet seulement d'atteindre 0,07% de surface fonctionnalisée, même avec les meilleures conditions d'hydrolyse expérimentées. Néanmoins, le thermoplastique fabriqué en laboratoire ne possède pas des

propriétés de fluidification adéquate. Aux températures plus basses que celle de dégradation, une grande pression est requise pour fluidifier correctement le copolymère et obtenir une bonne coalescence. Une première solution envisageable pour améliorer les résultats serait de fabriquer un copolymère possédant les mêmes ratios de chaque motif, mais avec une masse moléculaire beaucoup plus basse. Ceci peut être accompli en ajoutant une plus grande quantité de l'agent de transfert de chaîne n-butanethiol. Comme mentionné précédemment, les thermoplastiques possèdent de meilleures propriétés d'écoulement sous la chaleur lorsque la masse moléculaire diminue. Une deuxième solution envisageable serait d'augmenter le ratio d'acrylate d'éthyle afin de diminuer la température de transition vitreuse du copolymère. Lorsque les propriétés du copolymère permettront une bonne impression, chaque étape de la séquence de fonctionnalisation biologique pourra être étudiée de manière à permettre le meilleur rendement possible de chacune d'elles.

En somme, le copolymère fabriqué en laboratoire est donc un meilleur choix pour le développement de ce projet que l'utilisation d'un copolymère commercial. La fonctionnalisation de l'intérieur d'un canal d'un dispositif imprimé en 3D pourra être optimisée selon les besoins.

Chapitre 5 :

Capacités de l'imprimante 3D et améliorations

5.1. Modules de déposition

5.1.1. Système d'engrenages

Tel que mentionné précédemment, les modules d'impression peuvent être alimentés par un filament de thermoplastique d'un diamètre de 1,75 mm. Ce diamètre doit être précis. Des écarts jusqu'à 0,05 mm occasionnent des perturbations sur la pièce imprimée. Un diamètre plus grand que ce qui est prévu par les calculs des logiciels entraîne un surplus de polymère sur la pièce. Cela peut avoir comme conséquence l'obstruction d'un canal, par exemple, ou une mauvaise finition du dispositif. Un filament avec un diamètre légèrement inférieur pourrait entraîner un manque de polymère à certains endroits de la pièce et causer des fuites dans les parties fluidiques. Un écart de diamètre plus important que 0,05 mm est encore moins souhaitable, car cela empêche de faire la moindre impression. Un filament possédant un diamètre beaucoup trop petit ne se fait pas entraîner par les engrenages au-dessus du module de déposition. Le filament ne peut pas être acheminé à travers le module et ne peut donc pas être imprimé. Un filament d'un diamètre beaucoup trop grand ne passe pas adéquatement à travers les parties de la tête d'impression. Entre l'engrenage et le bas du module chauffé se situe un tube de Teflon® par lequel doit passer le filament. Le diamètre de ce tube restreint l'utilisation de filament plus gros que 1,75 mm. De plus, ce tube ne permet pas l'utilisation de filament rugueux, car le filament se bloque dans le tube. D'autres critères doivent aussi être respectés afin que les filaments puissent être imprimés. Les filaments ne doivent pas être trop cassants. Ils doivent résister à la pression effectuée par l'engrenage. Ceux-ci doivent rester rigides jusqu'à des températures avoisinant les 50°C.

Ce critère vient du fait que les engrenages se réchauffent en cours d'impression et ils peuvent atteindre cette température. Un polymère qui devient malléable à cette température peut s'enrouler autour de l'engrenage et occasionner un arrêt de l'impression. Pour diminuer l'importance de ce dernier problème, des ventilateurs peuvent être installés autour des engrenages. Étant donné qu'il y avait trois modules d'impression utilisés pour ce projet, l'idéal aurait été d'installer trois ventilateurs d'engrenage. Par contre, la configuration permettait d'installer un seul ventilateur adapté spécifiquement aux engrenages. Afin de refroidir les engrenages des deux autres modules de déposition, un système de tubes d'air comprimé a été installé dans l'enceinte de l'imprimante.

5.1.2. Pointes d'impression

Les pointes disponibles pour être installées à la sortie, au bas, des modules d'impression MK1-250 possèdent un diamètre interne de 0,35 mm ou de 0,50 mm. Pour le module d'impression MK1-350, les pointes disponibles sont seulement celles avec un diamètre interne de 0,50 mm. Pour le bon fonctionnement du logiciel d'impression, les diamètres doivent être les mêmes pour tous les modules utilisés sur une même pièce. Ce sont donc les pointes avec le diamètre interne de 0,50 mm qui seront utilisées. Il aurait été préférable d'utiliser des pointes ayant des diamètres internes plus petits, soit de 0,35 mm, afin d'obtenir une meilleure résolution.

D'autre part, les pointes d'origine ont été modifiées pour augmenter la qualité des pièces imprimées. Lors de l'impression, la pointe laisse le thermoplastique s'écouler sur la surface en un trait constant sur une longueur précise. Le deuxième trait à être imprimé est juste à côté du premier. La pointe du module passe donc très près du premier trait déjà imprimé. Si la pointe est trop large, elle pourrait abimer le premier trait de thermoplastique imprimé. Ce phénomène se répète pour chacune des lignes d'impression. Une des solutions pour améliorer la qualité de l'impression est de réduire le diamètre externe des pointes. La figure 29 montre les modifications qui ont été effectuées. Les rayons à la base des pointes ont

tous été réduits par affûtage. Grâce à cette modification, les pointes n'interfèrent plus avec les parties adjacentes déjà imprimées sur la pièce.

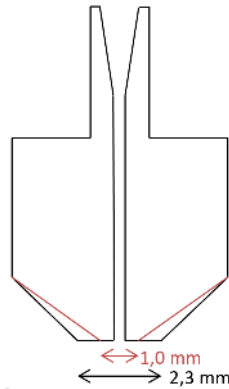


Figure 29. Modification des pointes d'impression par affûtage. Rouge : nouveau diamètre
Noir : diamètre d'origine

5.1.3. Refroidissement

Habituellement, pour l'impression 3D de thermoplastiques, la pièce imprimée doit être refroidie dès sa déposition sur la surface pour permettre au polymère à la sortie du module de figer au bon endroit. Les trois modules utilisés dans l'imprimante étaient munis chacun d'un ventilateur situé près de la sortie des pointes. Au fil des essais, ces ventilateurs n'ont pas résisté à la chaleur de la partie chauffée du module, ils ont donc été retirés et remplacés par un système fabriqué à partir de tubes d'air comprimé.

5.2. Surface d'impression

La surface d'impression originale est en aluminium. Par contre, il est préférable d'ajouter une plaque de verre sur la surface d'aluminium afin de ne pas abimer cette dernière. Néanmoins, ce n'est pas tous les thermoplastiques qui adhèrent directement sur le verre. Différentes expérimentations ont été effectuées sur des plaques de verre modifiées. La compagnie d'impression 3D suggérait deux méthodes afin d'améliorer l'adhérence des filaments imprimés. La première consistait à coller du ruban à masquer bleu sur la plaque de verre et d'imprimer les objets sur la face non adhésive du ruban. Cette méthode ne fonctionnait pas avec les thermoplastiques du projet, car ceux-ci ne collaient pas à la surface. Ils formaient plutôt une accumulation autour de la sortie de la pointe. La deuxième méthode était de vaporiser une couche épaisse et uniforme de fixatif à cheveux sur la surface de verre. Cette méthode a fonctionné pour quelques couches, mais les coins de la pièce se sont décollés durant l'impression. Ceci peut être causé par plusieurs phénomènes. Un premier phénomène peut être l'inégalité de la température sur la surface d'impression. En effet, celle-ci peut varier jusqu'à 6.7°C entre le centre et le bord de la surface d'impression. Les éléments chauffants du plateau pourraient être améliorés. Le décollement des coins peut aussi être causé par le manque d'adhésion entre la surface et le thermoplastique. D'autres méthodes d'amélioration des surfaces en verre ont donc été tentées. La plaque de verre a été modifiée à l'aide de composés silanes afin de modifier l'énergie de la surface d'impression. Les réactifs essayés sont ; le méthacryloxypropyltriméthoxysilane (MPTMS), l'amino-3-propyltriéthoxysilane (APTES), le phényltriéthoxysilane (PTES) et le triéthoxyoctylsilane (OTES). Après l'impression de plusieurs pièces sur les surfaces de verres modifiées chimiquement, les résultats d'adhésion obtenus ne sont pas meilleurs que ceux obtenus avec le fixatif. Un autre produit a été essayé par la suite, il s'agit du revêtement *CubeGlue* du distributeur Cubify. Avec ce produit, la pièce imprimée adhère entièrement à la surface tout au long du processus d'impression. De plus, il est facile de retirer la pièce imprimée de la surface une

fois l'impression terminée et le revêtement se dissout bien dans l'eau ce qui facilite la réutilisation des surfaces en verre.

5.3. Précision de l'impression

Dans cette section, les essais pour déterminer la précision et la résolution de l'impression de différentes formes sont présentés. Plusieurs pièces ont été imprimées avec du PLA. Sur chacune d'elles, il y a des motifs précis de plusieurs dimensions. Les motifs sont des colonnes dans le sens z, des cavités circulaires et rectangulaires dans le sens z ainsi que des canaux transversaux dans les sens x et y. Les tableaux 16 à 19 exposent les différents résultats obtenus. Les erreurs sur la mesure sont relatives à la dimension établie par le dessin 3D effectué à l'ordinateur. Les valeurs minimales sont les mesures des plus petits détails ayant été imprimés de façon adéquate. Ce ne sont pas les dimensions des plus petits détails possible, mais plutôt les plus petits détails ayant été essayés.

Généralement, les détails représentant des parties proéminentes sont plus grands que ce qui est prévu par le dessin et les détails représentant des canaux ou des cavités sont plus petits. Ces sources d'erreur sont causées par la programmation du parcours du module de déposition du thermoplastique. Le calcul de la largeur réelle du trait de polymère fondu déposé n'est pas exact. De plus, ce paramètre ne peut être ajusté. Il est donc nécessaire de concevoir un dessin à l'ordinateur en considérant les erreurs de chaque détail dans tous les axes. Selon les résultats du tableau 17, les canaux auront une meilleure précision s'ils sont dessinés dans le sens de l'axe x.

Tableau 16. Précision de l'impression de colonnes.

Colonnes sur le sens de l'axe z	Axe x	Axe y	Axe z
Erreur sur la mesure	0,22 à 0,98 mm plus grand	0,2 à 1,09 mm plus grand	0,01 mm plus petit à 0,16 mm plus grand
Valeur minimale	1,41 mm	1,42 mm	0,10 mm

Tableau 17. Précision de l'impression de canaux.

Sens de la longueur du canal :		Selon l'axe x	Selon l'axe y
Diamètre en y	Erreur sur la mesure	0,05 à 0,11 mm plus petit	-
	Valeur minimale	0,39 mm	-
Diamètre en x	Erreur sur la mesure	-	0,30 mm plus petit
	Valeur minimale	-	0,70 mm
Diamètre en z	Erreur sur la mesure	0,05 à 0,11 mm plus petit	0,30 mm plus petit
	Valeur minimale	0,39 mm	0,70 mm

Tableau 18. Précision de l'impression de cavités circulaires.

Cavités sur le sens de l'axe z	Axe x	Axe y	Axe z
Erreur sur la mesure	0,49 à 0,58 mm plus petit	0,67 à 0,87 mm plus petit	0,04 à 1,00 mm plus petit
Valeur minimale	2,42 mm	2,13 mm	0,10 mm

Tableau 19. Précision de l'impression des cavités rectangulaires.

Cavités sur le sens de l'axe z	Axe x	Axe y	Axe z
Erreur sur la mesure	0,20 à 1,10 mm plus petit	0,30 mm plus petit à 0,07 mm plus grand	4,34 mm plus petit à 0,05 mm plus grand
Valeur minimale	8,9 mm	0,51 mm	0,10 mm

4.1.8. Restriction d'impression

Des expérimentations ont été effectuées sur des pièces possédant des saillies, des parties qui dépassent sur le côté et qui ne sont pas en contact avec le plateau. Lorsqu'un dessin possédant de telles protubérances est importé dans le logiciel de l'imprimante, ce dernier procède automatiquement à la programmation de couches de thermoplastique supplémentaires sous les saillies. Ces couches ne possèdent pas une grande densité et le remplissage est aléatoire. La fonction des couches supplémentaires est de fournir un support de déposition au polymère formant les saillies pendant l'impression. Étant donné la faible densité, ces couches de support sont faciles à retirer après l'impression complète de la pièce.

Les hauteurs des saillies expérimentées, définies entre le plateau d'impression et le début de la forme, variaient de 0,52 mm à 3,00 mm. La portée de celles-ci était de 3,00 mm et les largeurs variaient de 1,00 mm à 2,00 mm. Après l'ajustement de plusieurs paramètres pour la création de supports, aucune des saillies ne s'est imprimée correctement.

Cette conclusion permet donc d'établir une condition à respecter, soit de ne pas avoir une pièce dont certaines parties sont imprimées au-dessus d'un espace vide. Pour cette raison, les canaux du dispositif biocapteur sont composés d'un plastique imprimé en même temps que les autres. De cette manière, le dessus des canaux gardera son intégrité, les couches

imprimées ne s'effondreront pas dans le vide laissé par le canal. Le thermoplastique qui contiennent les canaux est un polymère sacrificiel. Il est par la suite retiré par dissolution dans un solvant spécifique à ce thermoplastique.

5.4. Programmation de l'imprimante

Au cours du projet, les améliorations apportées aux logiciels Silc3r et REPETREL par les développeurs ont permis de travailler avec une pièce multimatériaux, ce qui n'était pas le cas au début du projet. En effet, durant la première année d'utilisation de l'imprimante, il n'était possible que d'imprimer un seul polymère à la fois sur le plateau. Il a toutefois été possible de déterminer les performances de l'imprimante pendant cette période. Plusieurs dispositifs possédant un seul thermoplastique ont été envisagés au début du projet, de même que des méthodes d'impression en séquence. Toutefois, la plus récente version à trois matériaux est la plus prometteuse.

5.5. Rétraction

En plus des paramètres de compression et de décompression du logiciel REPETREL décrit précédemment, lors d'une impression à plusieurs matériaux, il est nécessaire de contrôler le surplus et la rétraction du matériel dans le module de déposition entre les changements de module. Ces paramètres s'ajustent dans le logiciel Slic3r cette fois-ci. Certains thermoplastiques possèdent une très basse viscosité à leur température d'impression optimale, il peut alors se produire un écoulement non désiré lorsque le module d'impression est en attente ou se déplace entre deux sections d'un objet sur le plateau. De plus, si cet écoulement se produit, le recommencement de l'impression pour ce module ne donnera pas une couche complète, car un manque de thermoplastique se sera créé à l'intérieur du module. Il faut donc ajuster la rétraction du filament avant le déplacement et

le surplus de filament au redémarrage, après le déplacement. Ces paramètres se sont ajustés par « essais-erreurs » en effectuant l'impression de deux petits objets simultanément.

Si ces paramètres ne peuvent être ajustés à la perfection, il est aussi possible d'imprimer une bordure autour de l'objet. Cette bordure s'imprime couche par couche en même temps que la pièce. Elle est utilisée comme une préparation à l'impression des sections de l'objet, et ce, à chaque couche. Cela ralentit le processus d'impression, mais peut s'avérer utile en situation de développement.

Chapitre 6

Conception du dispositif

6.1. Dessin 3D par ordinateur

Pour le projet, le dessin du dispositif s'est généré à la suite de plusieurs itérations au fil de la recherche sur les capacités de l'imprimante 3D. Tel que mentionné précédemment, les dimensions du dessin par ordinateur ne seront pas les mêmes que celles sur le dispositif imprimé. Il est donc nécessaire d'ajuster le dessin 3D afin d'obtenir les bonnes dimensions sur la pièce réelle.

6.1.1. Canaux

Le canal doit inclure une partie centrale ayant comme fonction la détection des analytes. Cette partie centrale est la chambre d'analyse. Elle est plus large que les canaux pour permettre une plus grande surface de détection. Pour l'injection des produits dans le dispositif, un système à deux canaux a été sélectionné. Un canal sert à l'injection de tous les produits pour la fonctionnalisation et l'autre pour l'injection de l'échantillon. De cette manière, le contact entre les analytes et les biorécepteurs est priorisé dans la chambre d'analyse, et non avant, ce qui optimise le signal. De l'autre côté de la partie centrale, un seul canal de sortie est ajouté. La dimension des canaux a été déterminée selon les capacités actuelles de l'imprimante. Les premiers essais sont effectués avec des canaux d'un diamètre de 1,5 mm et une chambre d'analyse d'un diamètre de 3 mm et d'une longueur de 20mm.

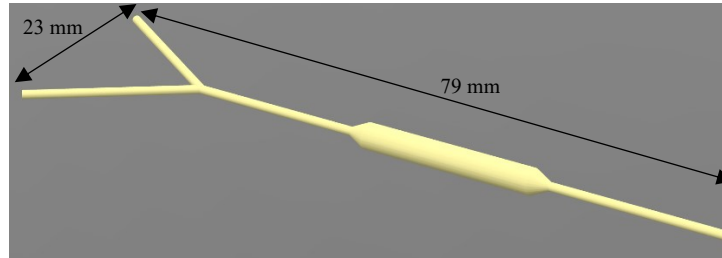


Figure 30. Dessin par ordinateur des canaux.

6.1.2. Fenêtre de détection

La partie centrale du dispositif, où les canaux seront fonctionnalisés, est constituée d'un thermoplastique précis. L'épaisseur entre la surface du dispositif et le canal de détection est importante. Selon la transparence, celle-ci ne doit pas être trop grande afin de favoriser le passage d'une forte intensité de longueurs d'onde. Il faut toutefois que le dispositif demeure solide. L'épaisseur sélectionnée pour débiter est de 1 mm.

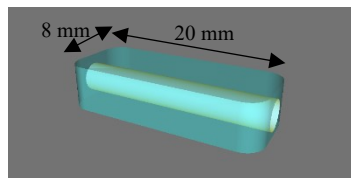


Figure 31. Dessin par ordinateur de la fenêtre de détection.

Les coins de toutes les formes ont été arrondis afin d'améliorer la qualité de l'impression. Lorsque le module de déposition fait un mouvement à 90° entre l'axe x et y, cela occasionne des imperfections sur le dispositif.

6.1.3. Structure

La structure est ce qui constitue la majorité du dispositif. Elle contient les parties des canaux qui ne sont pas fonctionnalisées, soit le début et la fin des canaux. Celle-ci doit être simple à imprimer. Elle ne doit pas être trop massive afin de réduire l'utilisation de thermoplastique. Une forme rectangulaire entourant les canaux a été choisie pour la structure.

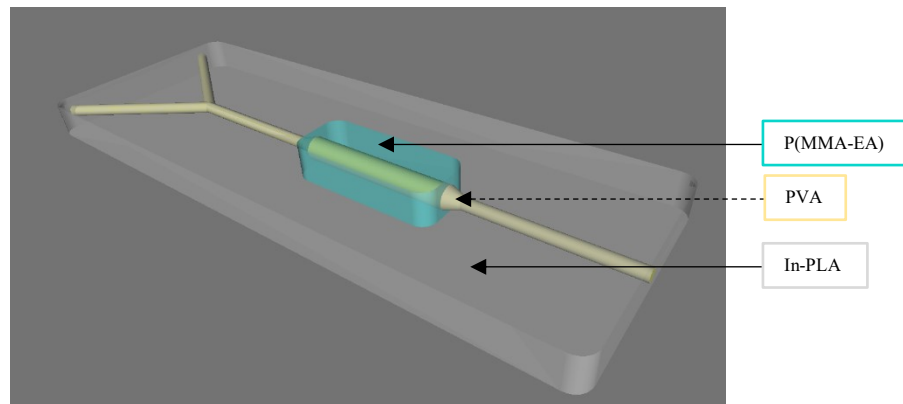


Figure 32. Dessin par ordinateur combiné des toutes les parties du dispositif.

6.2. Impression 3D

Comme il a été mentionné dans la deuxième partie du chapitre 4, le thermoplastique développé pour la biofonctionnalisation ne possédait pas une bonne capacité d'impression. La fluidité de celui-ci doit être améliorée, car il ne peut pas être imprimé en combinaison avec les autres matériaux sélectionnés.

Un dispositif a tout de même été imprimé avec le thermoplastique de la première partie du chapitre 4, le filament de P(MMA-EA) fabriqué à partir des granules commerciales. L'impression de ce dispositif a permis de développer cette section du projet en parallèle.

6.3. Optimisation individuelle de l'impression des thermoplastiques

Comme les réglages doivent être ajustés à chaque fois qu'un module est associé avec un nouveau thermoplastique, cette étape a été effectuée avant d'imprimer la pièce complète. Le tableau 20 présente les valeurs de base choisies pour chacun des thermoplastiques utilisés avec un module précis.

Tableau 20. Valeurs de réglage des engrenages des modules en fonction du matériel associé.

Module de déposition		MK1-250-1	MK1-250-2	MK1-350
<i>Thermoplastique</i>		<i>In-PLA</i>	<i>P(MMA-EA)</i> <i>à partir des granules</i>	<i>PVA</i>
Température (°C)		200	210	210
Feed rate (%)		1,1	1,7	1,5
Pulse/nL		0,78	1,1	0,90
Prime	Steps	200	300	200
	Speed	10 000	10 000	10 000
	Time (ms)	70	70	70
Unprime	Steps	200	200	200
	Speed	10 000	10 000	10 000
	Time (ms)	55	55	55

6.4. Impression simultanée des thermoplastiques

Le dispositif final obtenu par l'impression des trois thermoplastiques en simultané est représentatif de ce qui était attendu. Le fini de surface est acceptable et la pièce semble

complète. Le rebord de la pièce possède quelques surplus et une finition moins lisse, mais cela ne perturbe pas le fonctionnement du dispositif.

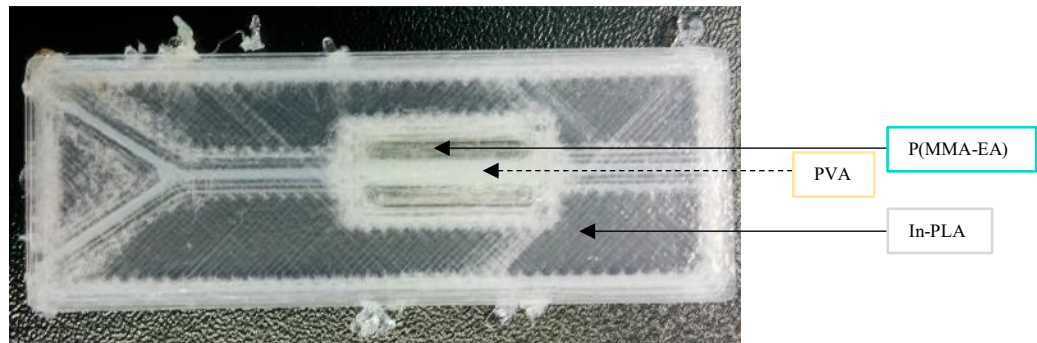


Figure 33. Dispositif imprimé en 3D avec In-PLA, P(MMA-EA) et PVA.

6.5. Post-traitement

6.5.1. Dissolution

Plusieurs essais ont été faits pour comparer l'efficacité de la dissolution du polymère sacrificiel constituant les canaux du dispositif. Le polystyrène à haut impact (HIPS) est soluble dans le limonène. L'alcool polyvinylique (PVA) est soluble dans l'eau. Pour une même quantité de thermoplastique à température égale du solvant, la dissolution du PVA dans l'eau est plus rapide. Cette différence est encore plus grande lorsque les thermoplastiques sacrificiels sont à l'intérieur d'un canal. Comme le limonène possède une plus grande viscosité que l'eau, celui-ci s'infiltre moins bien à l'intérieur du canal. De plus, pour solubiliser le PVA dans l'eau plus rapidement, l'eau peut être légèrement chauffée. Pour ces raisons, le PVA est un meilleur choix comme thermoplastique pour fabriquer les canaux. Toutefois, dans le dispositif complet imprimé, les canaux possèdent un petit diamètre. Des seringues ont été utilisées pour acheminer de l'eau tiède dans les canaux afin de compléter la dissolution du PVA.

6.5.2. Polissage

La fenêtre de détection au centre du dispositif doit être le plus lisse possible de manière à limiter la diffusion du signal de détection provenant de l'intérieur de la pièce. Le polissage du dispositif peut être fait au besoin. Une première méthode peut s'effectuer avec des vapeurs de solvant. Le solvant doit être compatible avec le matériel constituant la fenêtre de détection. Une autre technique qui peut être utilisée est le contact du dispositif avec une surface lisse préalablement chauffée. Des résultats préliminaires ont montré que cette dernière technique est plus rapide, offre un meilleur contrôle et risque moins d'abimer les autres parties du dispositif.

L'épaisseur de la fenêtre ainsi que le temps de polissage pourront être optimisés ultérieurement afin d'obtenir la meilleure transparence et, par le fait même, le signal le plus intense possible.

6.5.3. Arrondissement de canaux

La finition des canaux peut être une étape de post-traitement optionnelle. Elle a pour utilité d'éliminer les imperfections à l'intérieur des canaux au besoin. Cela peut être fait par injection d'une faible quantité de solvant dans les canaux.

6.6. Efficacité de l'impression

En somme, le dispositif imprimé pourrait être utilisé tel qu'il est. Même si la technique présente des limites au niveau de la précision, toutes les parties de la pièce imprimée représentent ce qui était attendu avec le dessin fait par ordinateur. Les canaux sont étanches lorsque de l'eau est injectée à l'intérieur de ceux-ci. La fenêtre d'analyse semble

transparente. L'intensité maximale pouvant traverser la couche de thermoplastique pourra être déterminée lors des étapes de validation de la biofonctionnalisation.

L'impression 3D par déposition de filament est une nouvelle technique qui nécessite des ajustements, mais elle peut permettre de faire avancer la recherche sur les dispositifs fluidiques, les biocapteurs et tout autre module fait de thermoplastique.

6.7. Conversion du dispositif en biocapteur

Le dispositif imprimé au cours de ce projet n'a pas été converti en biocapteur. Le thermoplastique de P(MMA-EA) utilisé comme fenêtre de détection, ainsi que comme surface interne des canaux, ne possède pas les propriétés adéquates afin de réaliser une fonctionnalisation optimale. Cette étape devra être effectuée lorsque le thermoplastique pour la biofonctionnalisation sera pleinement efficace tant au niveau biologique qu'au niveau de l'impression 3D.

CONCLUSION

Le développement de nouveaux systèmes analytiques portables est un sujet de recherche d'actualité. Les biocapteurs portables possèdent beaucoup d'avantages en comparaison aux méthodes de laboratoire traditionnelles. Ils sont plus accessibles, moins coûteux, le fonctionnement est facile et ils peuvent être utilisés à même le site d'échantillonnage. Dans la présente recherche, une nouvelle technique de fabrication de dispositif a été étudiée, soit l'impression tridimensionnelle de thermoplastique par la méthode de dépôt de fil en fusion. L'analyte d'intérêt visé par le projet est la microcystine-LR, une cyanotoxine présente mondialement et qui comporte des risques d'intoxication pour les humains comme pour les animaux.

La première partie de ce mémoire présente la problématique associée à la présence accrue de la cyanotoxine, la toxicité de celle-ci et l'importance de la détecter ou de la quantifier en vue d'effectuer les traitements de l'eau. Certaines méthodes d'analyses en laboratoire ou portable ont été présentées. Les avantages et les inconvénients de ces techniques ont aussi été abordés. Le développement d'un biocapteur portable et plus accessible que ceux présentés est une solution envisageable pour répondre aux besoins des utilisateurs.

Une brève présentation de la théorie sur la fabrication d'un biocapteur a été faite. Les différentes composantes et les besoins pour le projet ont été détaillés. De plus, les différentes approches possibles pour la fonctionnalisation de composés biologiques et la détection ont été mentionnées. Le système de détection qui a été retenu est celui qui permet une détection de la fluorescence suite à une interaction immunologique, par des anticorps et les antigènes correspondants. De plus, un préambule a été fait sur les aspects de l'impression tridimensionnelle et l'importance du choix des thermoplastiques. Plusieurs matériaux ont été sélectionnés pour correspondre à l'usage qui en sera fait dans le dispositif. L'acide polylactique (PLA) a été utilisé pour constituer la structure du dispositif et le thermoplastique sacrificiel d'alcool polyvinylique (PVA) pour former les canaux.

Le développement du thermoplastique utilisé pour la fonctionnalisation ainsi que pour la détection de l'analyte a été discuté au chapitre 4. Dans la première partie du chapitre, les résultats obtenus avec un thermoplastique commercial de P(MMA-EA) ont été présentés. Malgré plusieurs méthodes d'hydrolyse différentes, ce thermoplastique ne dispose pas de la réactivité adéquate afin de fonctionnaliser efficacement des anticorps à sa surface. La deuxième partie du chapitre a permis d'illustrer la possibilité de synthétiser un thermoplastique sur mesure, afin d'obtenir les critères souhaités pour la fonctionnalisation et l'impression 3D. Le copolymère choisi était composé d'acrylate d'éthyle, de méthacrylate de méthyle et d'acrylate de *tert*-butyle. Celui-ci possédait de meilleures propriétés pour la fonctionnalisation des anticorps de IgG que celui utilisé dans la partie précédente. Par contre, il ne répondait pas parfaitement au critère de viscosité pour permettre une bonne impression 3D.

Les résultats de l'optimisation de l'impression 3D obtenus ont été présentés. Il est possible de dire que l'impression 3D offre une bonne voie pour le développement de tels dispositifs. La précision de l'impression demeure le facteur le plus limitant de cette technique.

D'autre part, un dispositif a tout de même été imprimé afin de déterminer la possibilité d'utiliser cette technique pour la fabrication de biocapteurs. Au chapitre 6, les résultats obtenus avec les thermoplastiques de PVA, In-PLA et P(MMA-EA) sont présentés. La pièce obtenue correspondait à ce qui était attendu à partir du dessin créé à l'aide du logiciel de conception. De plus, après la dissolution du polymère sacrificiel de PVA, le dispositif permettait le passage de liquide sans qu'il n'y ait de fuite.

Pour les recherches subséquentes, la fluidité du thermoplastique synthétisé pourra être améliorée. Cela peut être fait en modifiant la proportion de monomères d'acrylate d'éthyle ou encore en abaissant la masse moléculaire. De cette façon, la production d'un filament et l'impression tridimensionnelle seront facilitées.

De manière parallèle, la séquence de fonctionnalisation avec les composés biologiques pourra être améliorée. L'optimisation en vue de la quantification pourra d'abord être

effectuée avec le couple de composés plus accessible d'IgG et d'anti-IgG avant d'être transposée avec le couple de composés ciblés pour la microcystine-LR.

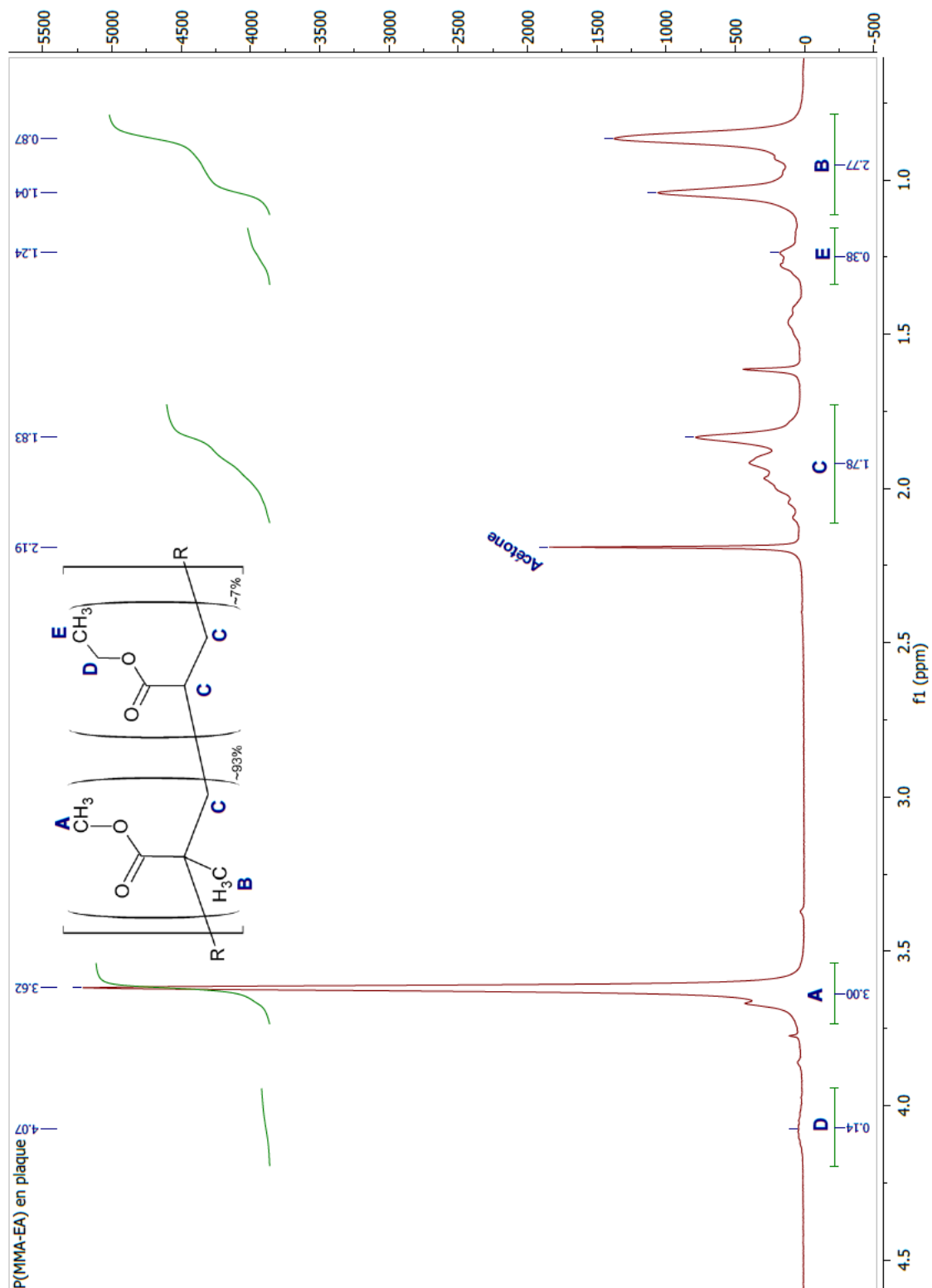
Le système qui sera alors performant pourra être intégré à un module de détection muni, entres-autres, d'une lampe et de fibres optiques.

En somme, les résultats présentés démontrent bien que la technique d'impression 3D pourrait être utile dans un contexte de recherche pour le développement de dispositifs tels que les biocapteurs fluidiques, qu'ils soient développés autant pour des analyses environnementales ou bien pharmaceutiques.

ANNEXES

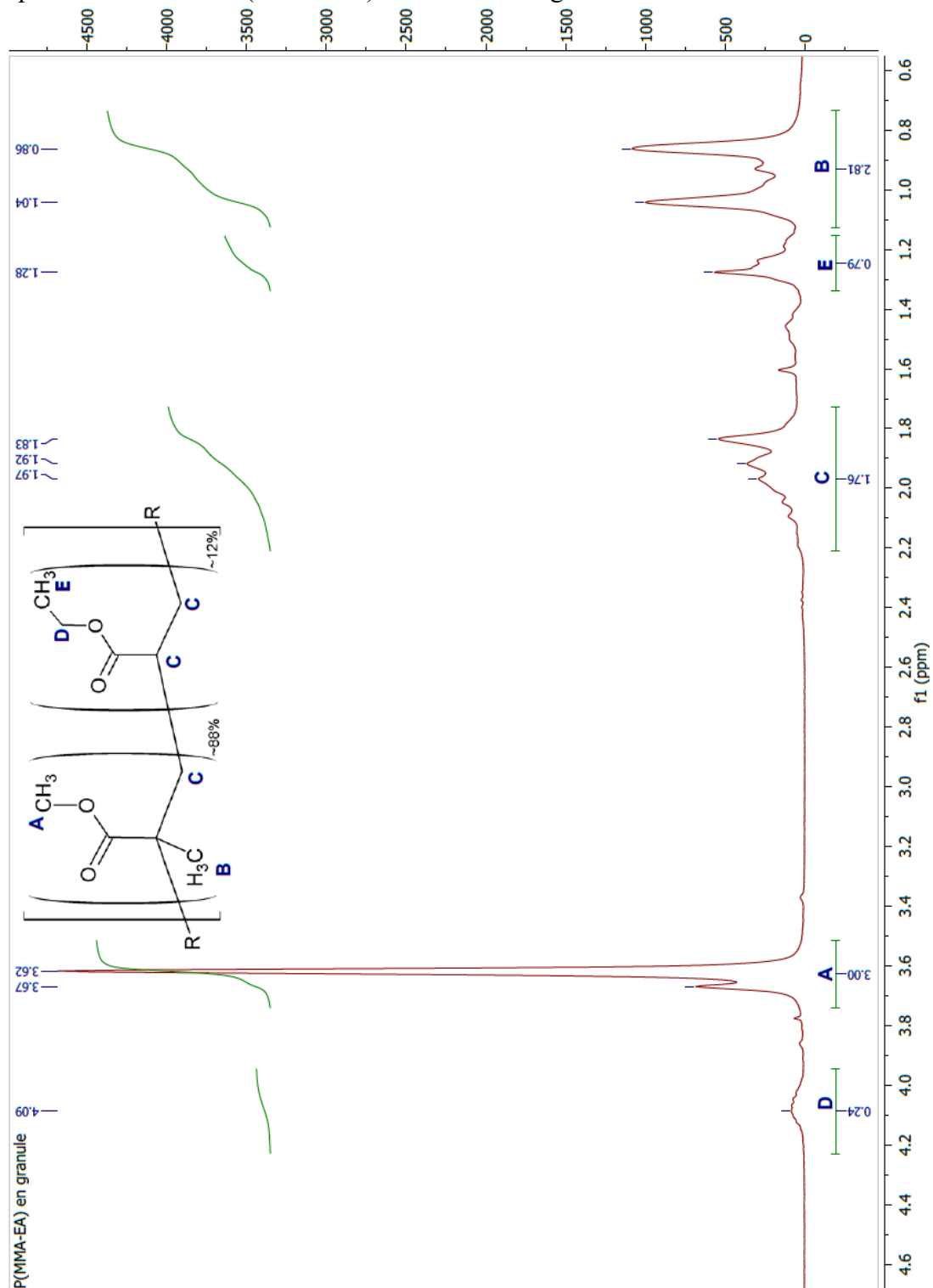
ANNEXE A

Spectre RMN ^1H du P(MMA-EA) commercial en plaque.



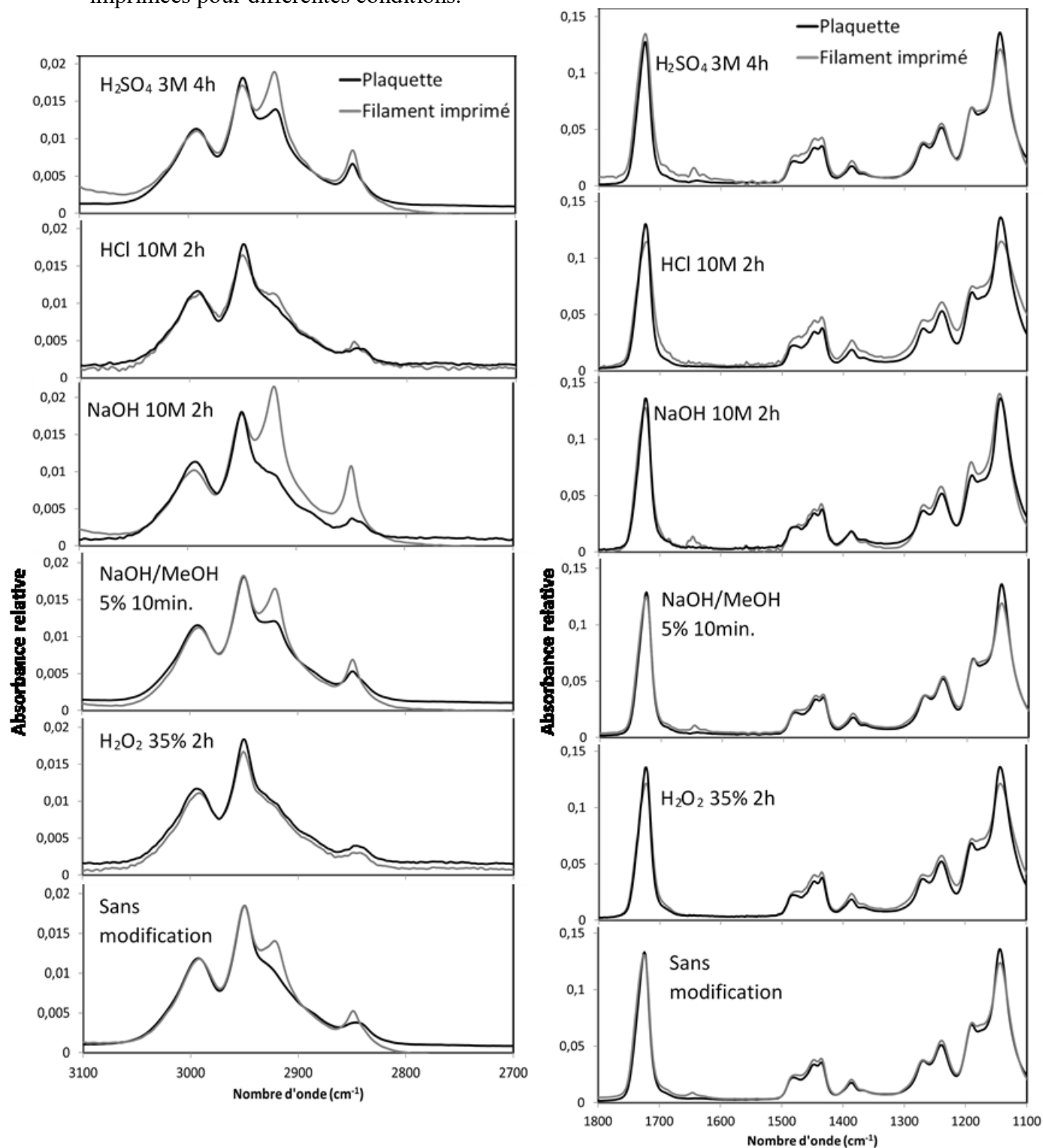
ANNEXE B

Spectre RMN ^1H du P(MMA-EA) commercial en granules.



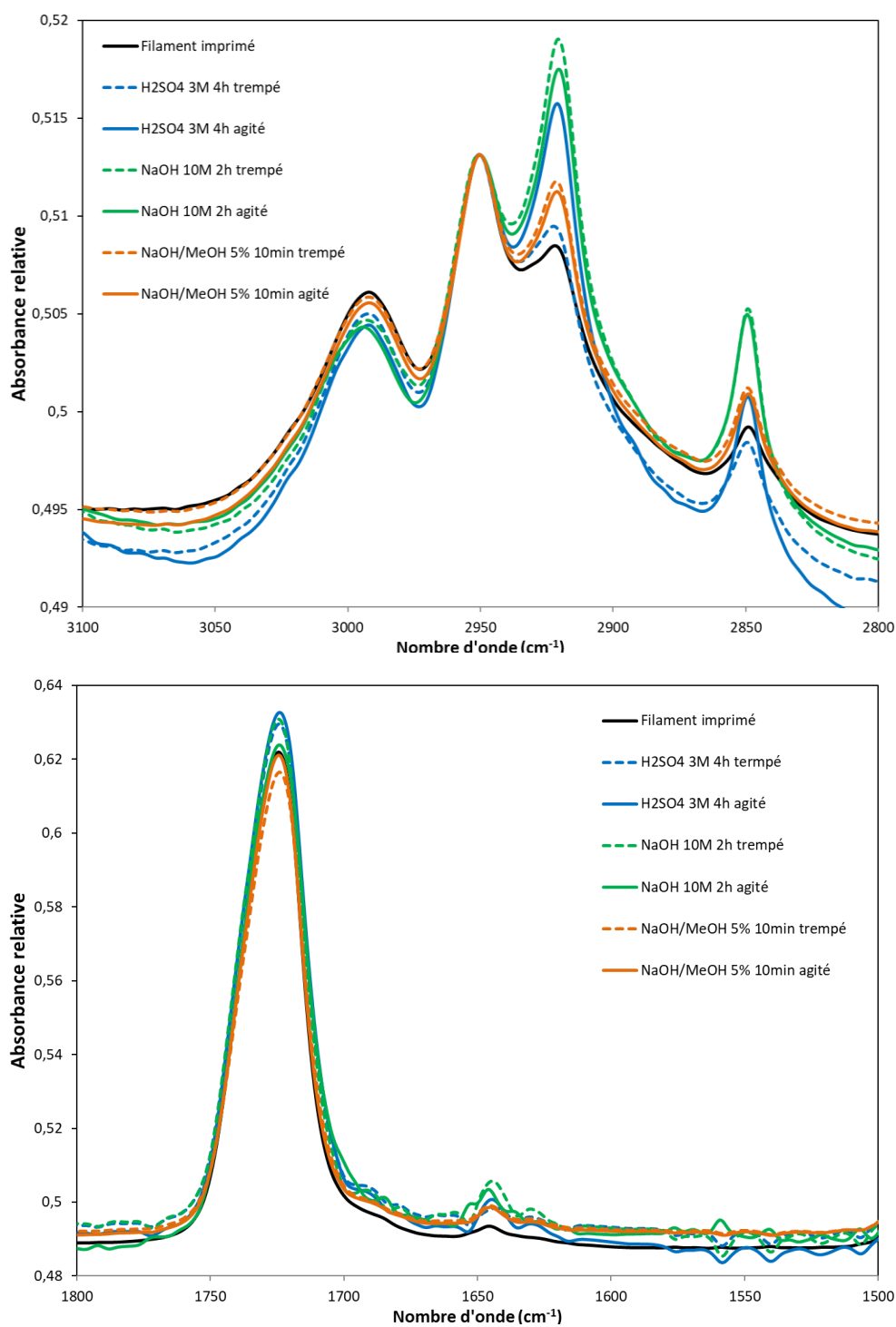
ANNEXE C

Comparaison des résultats obtenus par FTIR-ATR entre les plaquettes et les pièces imprimées pour différentes conditions.



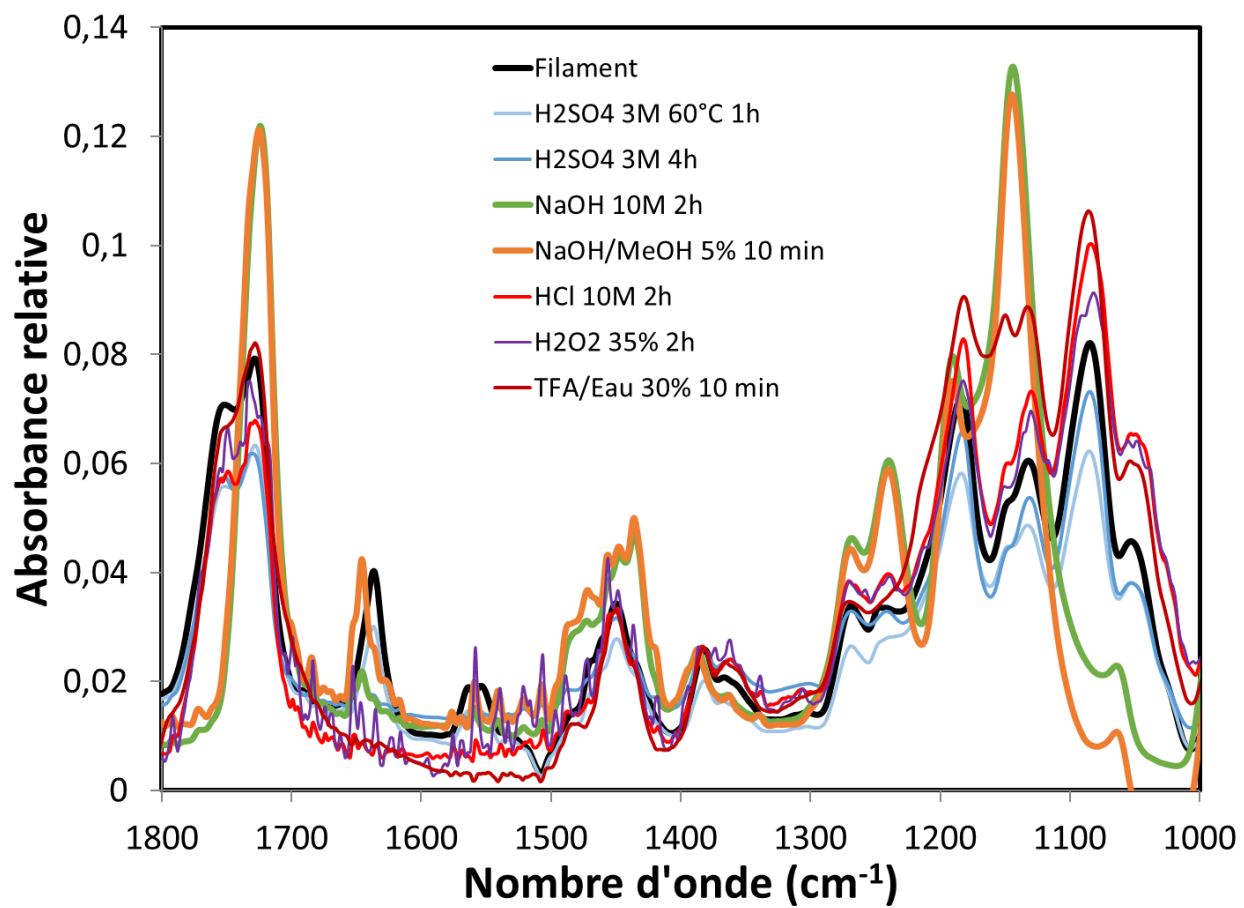
ANNEXE D

Résultats FTIR-ATR pour la comparaison entre les méthodes d'hydrolyse effectuées avec ou sans agitation pour trois conditions sélectionnées.



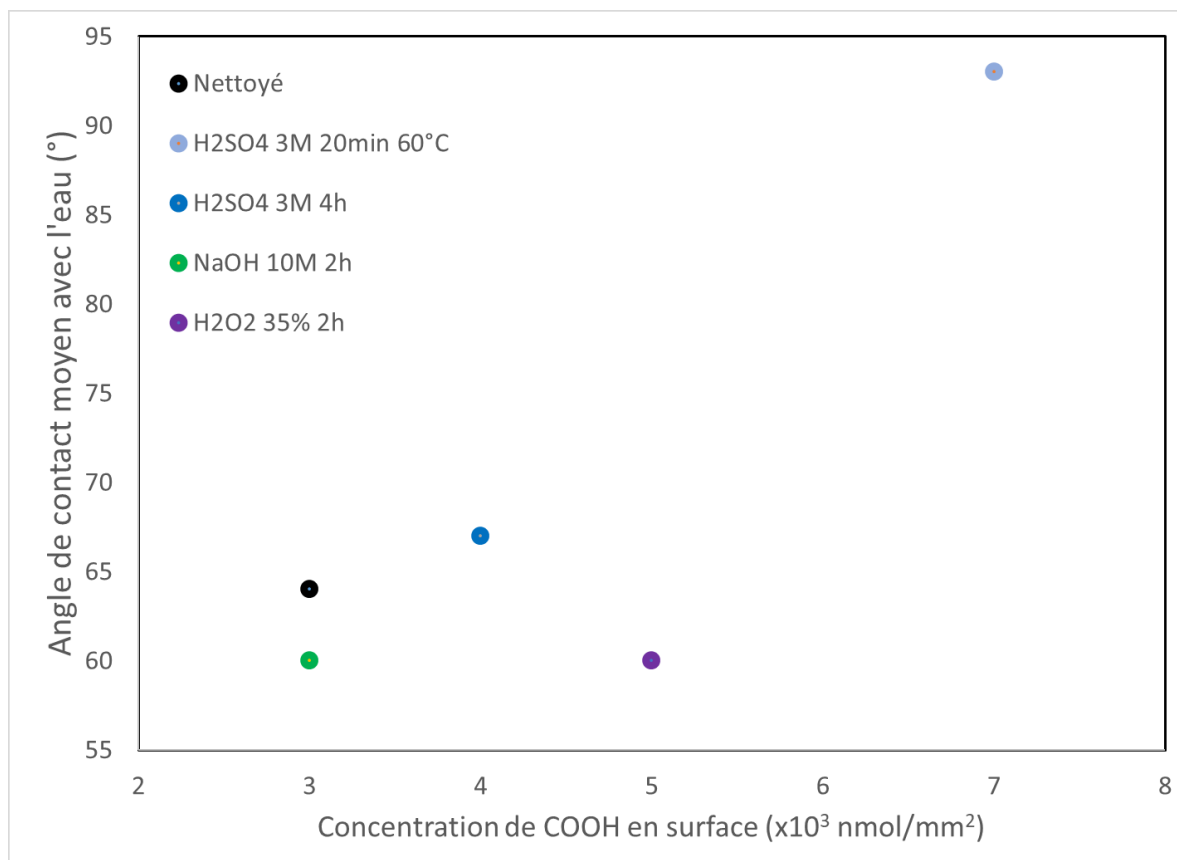
ANNEXE E

Résultats des analyses FTIR-ATR des surfaces de PLA soumis aux conditions sélectionnées.



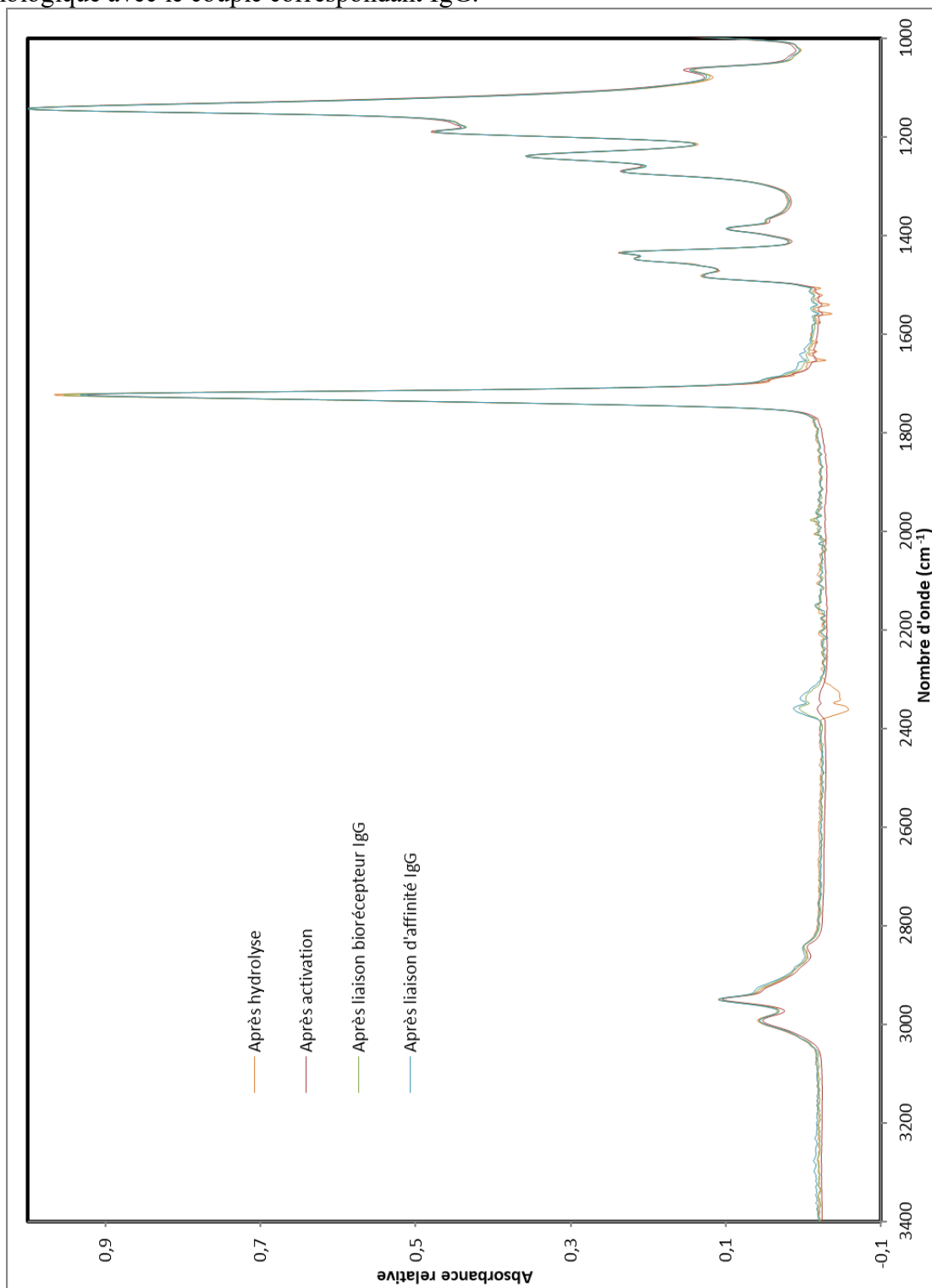
ANNEXE F

Représentation de l'absence de corrélation entre la mesure de la concentration de groupements acide carboxylique par colorimétrie et la mesure d'angle de contact avec l'eau.



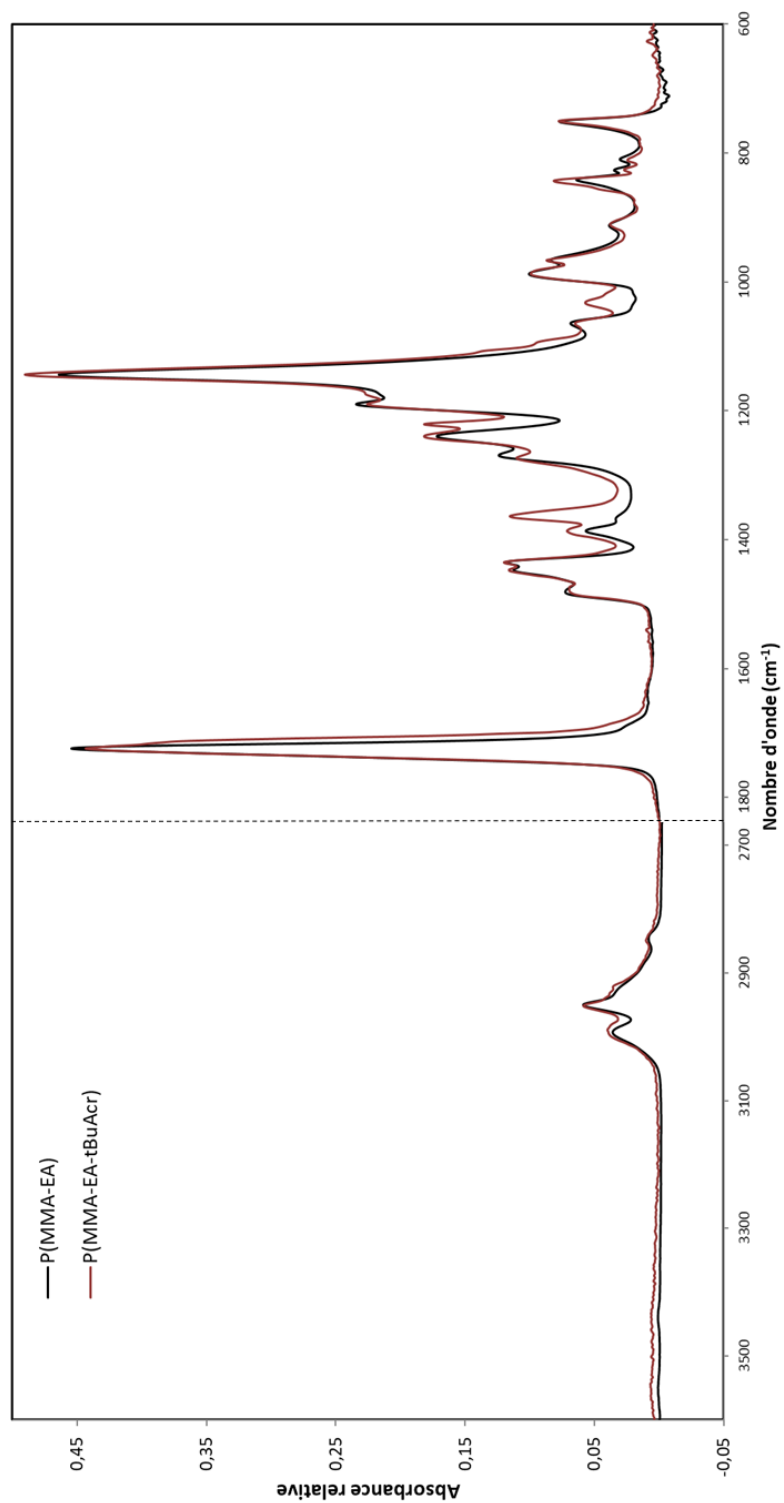
ANNEXE G

Résultats d'analyses FTIR-ATR après les différentes étapes de la fonctionnalisation biologique avec le couple correspondant IgG.



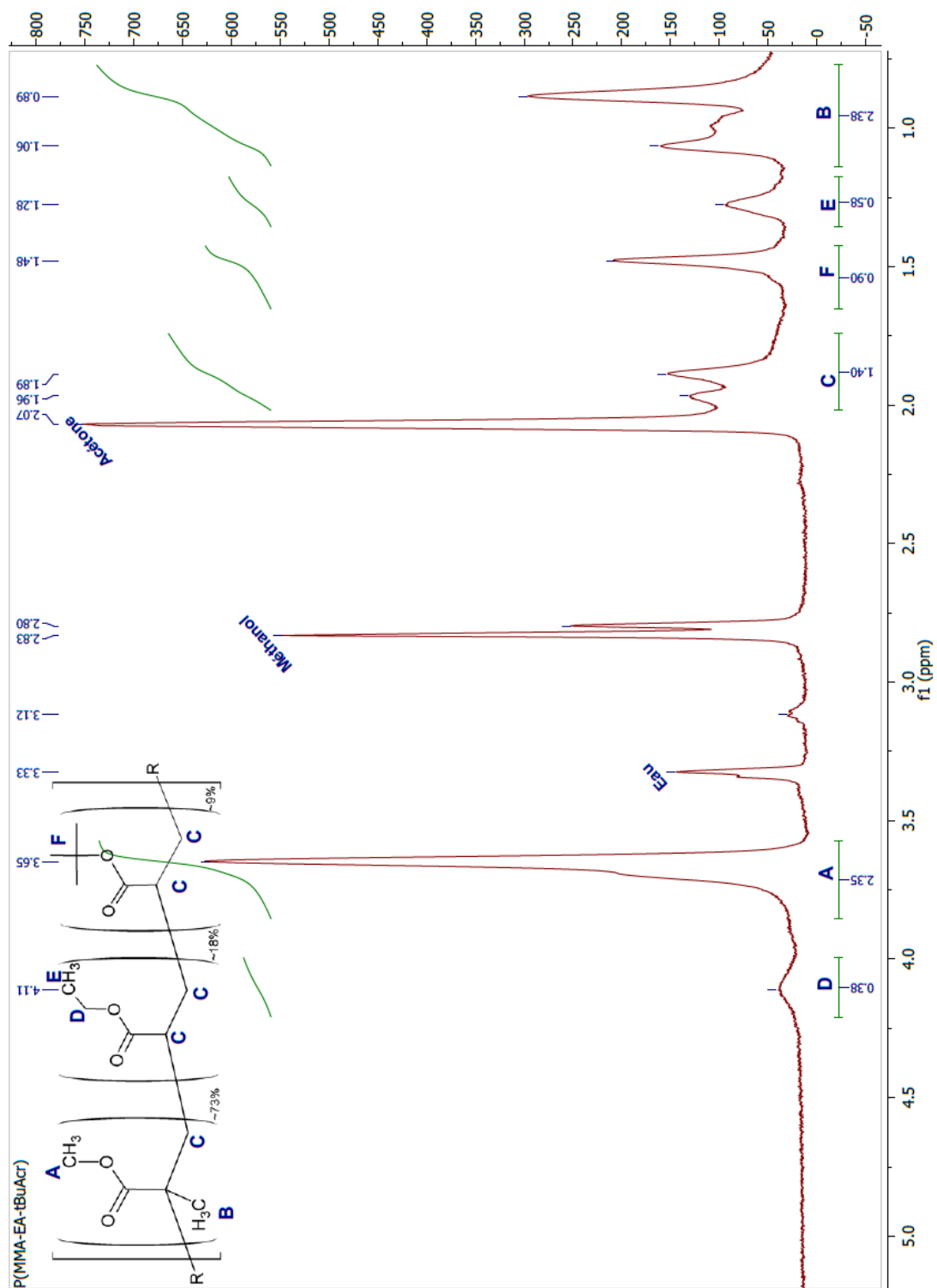
ANNEXE H

Superposition des spectrogrammes obtenus par FTIR-ATR du copolymère commercial P(MMA-EA) et de celui polymérisé en laboratoire, P(MMA-EA-tBuAcr).



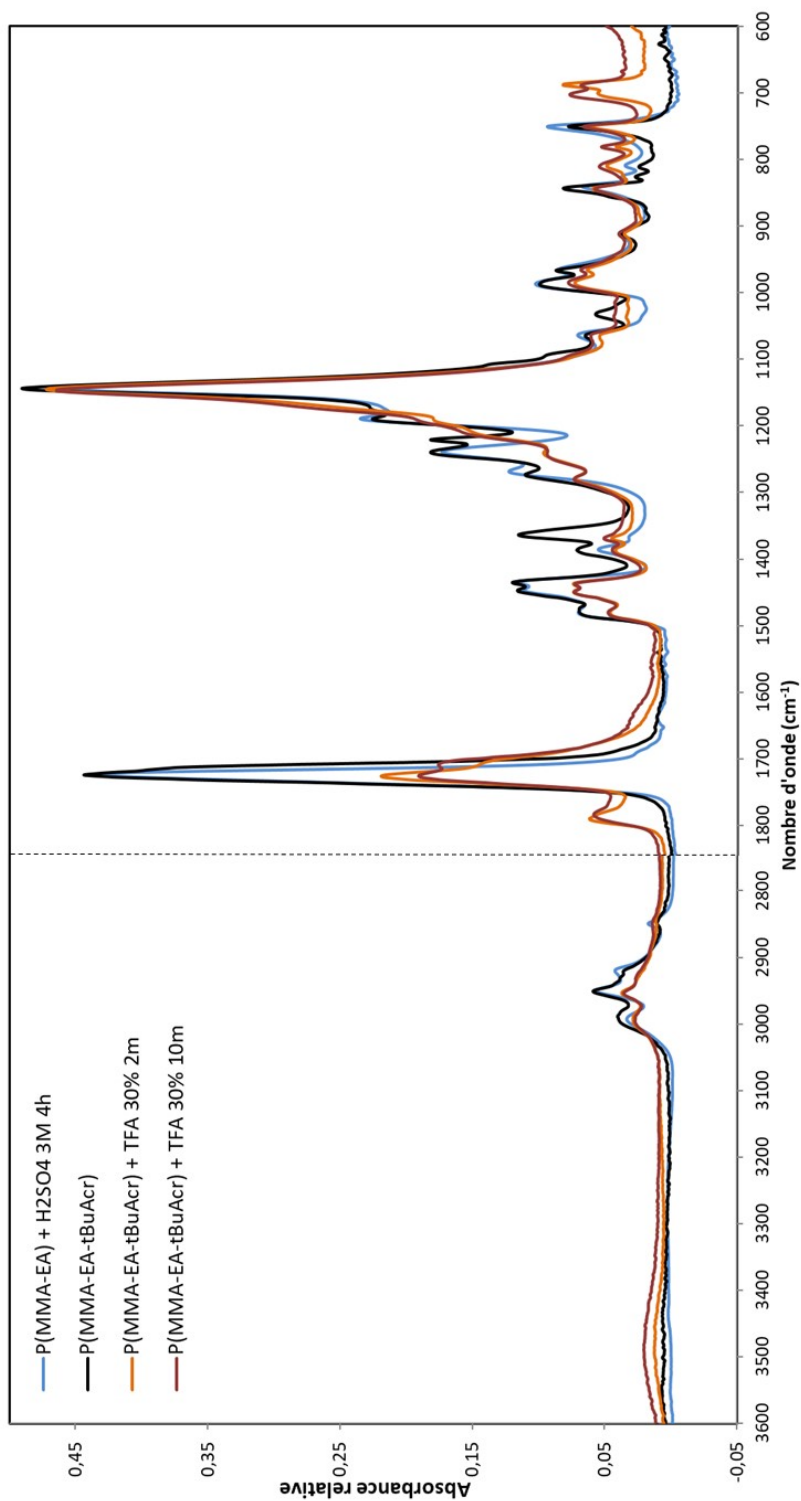
ANNEXE I

Spectre RMN ^1H du P(MMA-EA-tBuAcr) polymérisé en laboratoire.



ANNEXE J

Spectrogramme obtenu par FTIR-ATR pour le P(MMA-EA-tBuAcr) original et hydrolysé selon deux conditions, comparé au P(MMA-EA) hydrolysé de la Partie 1.



RÉFÉRENCES

- [1] Santé Canada, **(2002)** *Les toxines cyanobactériennes — Les microcystines-LR*, Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada : pièces à l'appui.
- [2] Barbeau, B., Carrière, A., Prévost, M., Zamyadi, A., et Chevalier, P., **(2008)** *Changements climatiques : Analyse de la vulnérabilité des installations québécoises de traitement de l'eau potable aux cyanobactéries toxiques*, École Polytechnique de Montréal, Chaire Industrielle CRSNG en eau potable.
- [3] Wang, L., Chen, W., Xu, D., Shim, B.S., Zhu, Y., Sun, F., Liu, L., Peng, C., Jin, Z., Xu, C., et Kotov, N.A., **(2009)** *Simple, Rapid, Sensitive, and Versatile SWNT-Paper Sensor for Environmental Toxin Detection Competitive with ELISA*. Nano Letters, 9(12): p. 4147-4152.
- [4] Zhang, F., Yang, S. H., Kang, T. Y., Cha, G. S., Nam, H., et Meyerhoff, M. E., **(2007)** *A rapid competitive binding nonseparation electrochemical enzyme immunoassay (NEEIA) test strip for microcystin-LR (MCLR) determination*. Biosens Bioelectron, 22(7): p. 1419-25.
- [5] Morais, S., Tamarit-Lopez, J., Puchades, R., et Maquieira, A., **(2010)** *Determination of Microcystins in River Waters Using Microsensor Arrays on Disk*. Environ. Sci. Technol., 44: p. 9024-9029.
- [6] Long, F., He, M., Zhu, A. N., et Shi, H. C., **(2009)** *Portable optical immunosensor for highly sensitive detection of microcystin-LR in water samples*. Biosens Bioelectron, 24(8): p. 2346-51.
- [7] Herranz, S., Marazuela, M. D., et Moreno-Bondi, M. C., **(2012)** *Automated portable array biosensor for multisample microcystin analysis in freshwater samples*. Biosens Bioelectron, 33(1): p. 50-5.
- [8] Lindner, P., Molz, R., Yacoub-George, E., et Wolf, H., **(2009)** *Rapid chemiluminescence biosensing of microcystin-LR*. Anal Chim Acta, 636(2): p. 218-23.
- [9] Xiang, A., Lei, X., Ren, F., Zang, L., Wang, Q., Zhang, J., Lu, Z., et Guo, Y., **(2014)** *An aptamer-based immunoassay in microchannels of a portable analyzer for detection of microcystin-leucine-arginine*. Talanta, 130: p. 363-9.
- [10] Liu, L., Xing, C., Yan, H., Kuang, H., et Xu, C., **(2014)** *Development of an ELISA and immunochromatographic strip for highly sensitive detection of microcystin-LR*. Sensors (Basel), 14(8): p. 14672-85.
- [11] Sun, J., Li, Y., Pi, F., Ji, J., Zhang, Y., et Sun, X., **(2017)** *Using fluorescence immunochromatographic test strips based on quantum dots for the rapid and sensitive determination of microcystin-LR*. Anal Bioanal Chem, 409: p. 2213-2220.
- [12] Queiros, R. B., Noronha, J. P., Marques, P. V., Fernandes, J. S., et Sales, M. G., **(2012)** *Determination of microcystin-LR in waters in the subnanomolar range by*

- sol-gel imprinted polymers on solid contact electrodes*. Analyst, 137(10): p. 2437-44.
- [13] Feng, L., Zhu, A., Wang, H., et Shi, H., (2014) *A nanosensor based on quantum-dot haptens for rapid, on-site immunoassay of cyanotoxin in environmental water*. Biosens Bioelectron, 53: p. 1-4.
 - [14] Yu, H. W., Jang, A., Kim, L. H., Kim, S. J., et Kim, I. S., (2011) *Bead-based competitive fluorescence immunoassay for sensitive and rapid diagnosis of cyanotoxin risk in drinking water*. Environ Sci Technol, 45(18): p. 7804-11.
 - [15] Catanante, G., Espin, L., et Marty, J. L., (2015) *Sensitive biosensor based on recombinant PP1 α for microcystin detection*. Biosensors and Bioelectronics, 67(0): p. 700-707.
 - [16] Campas, M., Szydlowska, D., Trojanowicz, M., et Marty, J. L., (2007) *Enzyme inhibition-based biosensor for the electrochemical detection of microcystins in natural blooms of cyanobacteria*. Talanta, 72(1): p. 179-86.
 - [17] Lambert, T.W., Boiand, M.P., Holmes, C.F.B., et Hrudelyt, S.E., (1994) *Quantitation of the Microcystin Hepatotoxins in Water at Environmentally Relevant Concentrations with the Protein Phosphatase Bioassay*. Environmental science & technology, 28(2): p. 753-755.
 - [18] Hessel, V., Tibhe, J., Noël, T., et Wang, Q., (2014) *Biotechnical Micro-Flow Processing at the EDGE – Lessons to be learnt for a Young Discipline*. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly Journal, 28(2): p. 167-188.
 - [19] Siriviriyanun, Ampornphan, O'Rear, Edgar A., et Yanumet, Nantaya, (2007) *Modification of polyester fabric properties by surfactant-aided surface polymerization*. Journal of Applied Polymer Science, 103(6): p. 4059-4064.
 - [20] Clarizia, L. J., Sok, D., Wei, M., Mead, J., Barry, C., et McDonald, M. J., (2009) *Antibody orientation enhanced by selective polymer-protein noncovalent interactions*. Anal Bioanal Chem, 393(5): p. 1531-8.
 - [21] Ellis, D., (2009) *Guide d'intervention pour les propriétaires, les exploitants ou les concepteurs de stations de production d'eau potable municipales aux prises avec une problématique de fleurs d'eau de cyanobactéries*, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, Direction des politiques de l'eau, Québec, ISBN 978-2-550-53297-2, 46 p.
 - [22] Chorus, I. et Bartram, J., eds., (1999) *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*, World Health Organisation.
 - [23] Fott, B., (1971) *Algenkunde*. 2nd. ed. VEB Fisher, Jena: p. 581 pp.
 - [24] Encyclopedia.com. Cyanobacteria, <http://www.encyclopedia.com/plants-and-animals/microbes-algae-and-fungi/moneran-and-protistan/cyanobacteria> [En ligne; accès le 16-08-2017].
 - [25] Paerl, H.W., (2014) *Mitigating harmful cyanobacterial blooms in a human- and climatically-impacted world*. Life (Basel), 4(4): p. 988-1012.
 - [26] Paerl, H. W., Hall, N. S., et Calandrino, E. S., (2011) *Controlling harmful cyanobacterial blooms in a world experiencing anthropogenic and climatic-induced change*. Sci Total Environ, 409(10): p. 1739-45.

- [27] van Apeldoorn, M. E., van Egmond, H. P., Speijers, G. J., et Bakker, G. J., (2007) *Toxins of cyanobacteria*. Mol Nutr Food Res, 51(1): p. 7-60.
- [28] Ueno, Y., Nagata, S., Tsutsumi, T., Hasegawa, A., Yoshida, F., Suttajit, M., Mebs, D., Pütsch, M., et Vasconcelos, V., (1996) *Survey of microcystins in environmental water by a highly sensitive immunoassay based on monoclonal antibody*. Natural Toxins, 4(6): p. 271-276.
- [29] Hoöger, S.J., (2003) *Problems during drinking water treatment of cyanobacterial-loaded surface waters: consequences for human health (Thèse)*, Gefördert durch die Deutsche Bundesstiftung Umwelt (DBU), 208.
- [30] Costa, I. A. S., Azevedo, S. M. F. O., Senna, P. A. C., Bernardo, R. R., Costa, S. M., et Chellappa, N. T., (2006) *Occurrence of toxin-producing cyanobacteria blooms in a Brazilian Semiarid reservoir*. Brazilian Journal of Biology, 66(1B): p. 211-219.
- [31] Vieira, J.M.D.S., Azevedo, M.T.D.P, de Oliveira Azevedo, S. M., Honda, R. Y., et Correa, B., (2005) *Toxic cyanobacteria and microcystin concentrations in a public water supply reservoir in the Brazilian Amazonia region*. Toxicon, 45(7): p. 901-9.
- [32] Lambert, T.W., Holmes, C.F.B., et Hruday, S.E., (1996) *Adsorption of microcystin-LR by activated carbon and removal in full scale water treatment*. Water Research, 30(6): p. 1411-1422.
- [33] Kotak, B. G. et Zurawell, R. W., (2007) *Cyanobacterial toxins in Canadian freshwaters: A review*. Lake and Reservoir Management, 23(2): p. 109-122.
- [34] Carriere, A., Prevost, M., Zamyadi, A., Chevalier, P., et Barbeau, B., (2010) *Vulnerability of Quebec drinking-water treatment plants to cyanotoxins in a climate change context*. J Water Health, 8(3): p. 455-65.
- [35] Rolland, A., Bird, D. F., et Giani, A., (2005) *Seasonal changes in composition of the cyanobacterial community and the occurrence of hepatotoxic blooms in the eastern townships, Quebec, Canada*. Journal of Plankton Research, 27(7): p. 683-694.
- [36] Park, H.-D., Kim, B., Kim, E., et Okino, T., (1998) *Hepatotoxic Microcystins and Neurotoxic Anatoxin-a in Cyanobacterial Blooms from Korean Lakes*. Environmental Toxicology and Water Quality, 13: p. 225-234.
- [37] Hotto, A., Satchwell, M., et Boyer, G., (2005) *Seasonal production and molecular characterization of microcystins in Oneida Lake, New York, USA*. Environ Toxicol, 20(3): p. 243-8.
- [38] Maatouk, I., Bouaïcha, N., Fontan, D., et Levi, Y., (2002) *Seasonal variation of microcystin concentrations in the Saint-Caprais reservoir (France) and their removal in a small full-scale treatment plant*. Water Research, 36: p. 2891-2897.
- [39] Messineo, V., Mattei, D., Melchiorre, S., Salvatore, G., Bogialli, S., Salzano, R., Mazza, R., Capelli, G., et Bruno, M., (2006) *Microcystin diversity in a Planktothrix rubescens population from Lake Albano (Central Italy)*. Toxicon, 48(2): p. 160-74.
- [40] Jurczak, T., Tarczyska, M., Izydorczyk, K., Mankiewicz, J., Zalewski, M., et Meriluoto, J., (2005) *Elimination of microcystins by water treatment processes-examples from Sulejow Reservoir, Poland*. Water Res, 39(11): p. 2394-406.

- [41] Bláha, L. et Marsálek, B., (2003) *Contamination of drinking water in the Czech Republic by microcystins*. Archiv Für Hydrobiologie, 158(3): p. 421-429.
- [42] Ndebele, M.R. et Magadza, C.H.D., (2006) *The occurrence of microcystin-LR in Lake Chivero, Zimbabwe*. Lakes and Reservoirs: Research and Management, 11(1): p. 57-62.
- [43] Grosse, Y., Baan, R., Straif, K., Secretan, B., El Ghissassi, F., et Coglianò, V., (2006) *Carcinogenicity of nitrate, nitrite, and cyanobacterial peptides*. Lancet Oncology, 7(8): p. 628-629.
- [44] World Health Organisation, (1998) *Guidelines for Drinking-Water Quality*, Second Edition, Volume 2 - Health Criteria and Other Supporting Information - Addendum.
- [45] Fawell, J.K., (1999) *The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: I Microcystin-LR*. Human & Experimental Toxicology, 18(3): p. 162-167.
- [46] World Health Organization, (2011) *Guidelines for Drinking-water Quality*, Fourth Edition.
- [47] Eriksson, J.E., Grönberg, L., Nygård, S., Slotte, J.P., et Meriluoto, J.A.O., (1990) *Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1025(1): p. 60-66.
- [48] Puddick, J., Prinsep, M. R., Wood, S. A., Kaufononga, S. A., Cary, S. C., et Hamilton, D. P., (2014) *High levels of structural diversity observed in microcystins from Microcystis CAWBG11 and characterization of six new microcystin congeners*. Mar Drugs, 12(11): p. 5372-95.
- [49] INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, (2010) *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Ingested Nitrate and Nitrite, and Cyanobacterial Peptide Toxins*, Volume 94.
- [50] Zhan, L., Sakamoto, H., Sakuraba, M., Wu, D.-S., Zhang, L.-S., Suzuki, T., Hayashi, M., et Honma, M., (2004) *Genotoxicity of microcystin-LR in human lymphoblastoid TK6 cells*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 557(1): p. 1-6.
- [51] Lankoff, A., Krzowski, L., Glab, J., Banasik, A., Lisowska, H., Kuszewski, T., Gozdz, S., et Wojcik, A., (2004) *DNA damage and repair in human peripheral blood lymphocytes following treatment with microcystin-LR*. Mutat Res, 559(1-2): p. 131-42.
- [52] MacKintosh, C., Beattie, K.A., Klumpp, S., Cohen, P., et Codd, G.A., (1990) *Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants*. FEBS, 264(2): p. 187-192.
- [53] Csaba, M., Dániel, B., Márta, M.H., et Gábor, V., (2016) *The Effects of Microcystins (Cyanobacterial Heptapeptides) on the Eukaryotic Cytoskeletal System*. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 16(13): p. 1063-1077.
- [54] Falconer, I.R., Jackson, A.R.B., Langley, J., et Runnegar, M.T.C., (1981) *Liver Pathology in Mice in Poisoning by the Blue-Green Alga Microcystis aeruginosa*. Australian Journal of Biological Sciences, 34: p. 179-187.

- [55] Xu, Y., Xing, Y., Chen, Y., Chao, Y., Lin, Z., Fan, E., Yu, J. W., Strack, S., Jeffrey, P. D., et Shi, Y., (2006) *Structure of the protein phosphatase 2A holoenzyme*. Cell, 127(6): p. 1239-51.
- [56] Runnegar, M., Berndt, N., et Kaplowitz, N., (1995) *Microcystin Uptake and Inhibition of Protein Phosphatases: Effects of Chemoprotectants and Self-Inhibition in Relation to Known Hepatic Transporters*. Toxicology and Applied Pharmacology, 134(2): p. 264-272.
- [57] Gouvernement du Québec, (2017) *Règlement sur la qualité de l'eau potable (chapitre Q-2, r.40)*, Loi sur la qualité de l'environnement.
- [58] Wannemacher, R.W., (1989) *Chemical stability and laboratory safety of naturally occurring toxins*. US Army medical research, institute of infectious disease, Fort Detrick: p. 9-11.
- [59] Harada, K.I., Tsuji, K., Watanabe, M.F. , et F., Kondo, (1996) *Stability of microcystins from cyanobacteria—III. Effect of pH and temperature*. Phycologia, 35(6S): p. 83-88.
- [60] He, Y.-Y. et Häder, D.-P., (2002) *Reactive oxygen species and UV-B: effect on cyanobacteria*. Photochem. Photobiol. Sci., 1(10): p. 729-736.
- [61] American Waterworks Association, (2001) *AWWA Standard for Granular Filter Material*, ANSI/AWWA B100-01.
- [62] Cheng, Y. S., Zhou, Y., Irvin, C. M., Kirkpatrick, B., et Backer, L. C., (2007) *Characterization of Aerosols Containing Microcystin*. Marine Drugs, 5: p. 136-150.
- [63] Kenefick, S.L. , Hrudef, S.E. , Peterson, H.G. , et Prepas, E.E. , (1993) *Toxin Release from Microcystis Aeruginosa after Chemical Treatment*. Water Science and Technology, 27(3-4): p. 433-440.
- [64] Arnade, L.J., (1999) *Seasonal Correlation of Well Contamination and Septic Tank Distance*. Ground Water, 37(2): p. 920-923.
- [65] Sanchez, J.S., Nuth, M., Cabana, H., Leduc, R., et Husk, B., (2015) *Bilan hydrique et relation entre la qualité de l'eau souterraine captée par les puits riverains et l'eau du Petit Lac Saint-François à Saint-François-Xavier-de-Brompton, Québec, Canada*, Chapitre Saint-Laurent, SRA-SETAC.
- [66] Groupe scientifique sur l'eau. (2017) *Cyanobactéries et cyanotoxines dans l'eau potable et l'eau récréative*, Fiches synthèses sur l'eau potable et la santé humaine, Institut national de santé publique du Québec, <https://www.inspq.qc.ca/eau-potable/cyanobacteries> [En ligne; accès le 19-07-2017].
- [67] Groupe H2O. (2017) *Traitements de l'eau - Problèmes et solutions*, <http://www.traitement-eau-laurentides.ca/problemes-et-solutions-traitement-eau.aspx> [En ligne; accès le 19-07-2017].
- [68] Ye, Wenjin, Liu, Xianglong, Tan, Jing, Li, Daotang, et Yang, Hong, (2009) *Diversity and dynamics of microcystin—Producing cyanobacteria in China's third largest lake, Lake Taihu*. Harmful Algae, 8(5): p. 637-644.
- [69] Shi, H. C., Song, B. D., Long, F., Zhou, X. H., He, M., Lv, Q., et Yang, H. Y., (2013) *Automated online optical biosensing system for continuous real-time determination of microcystin-LR with high sensitivity and specificity: early*

- warning for cyanotoxin risk in drinking water sources*. Environ Sci Technol, 47(9): p. 4434-41.
- [70] CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC, (2012) *Identification, dénombrement et estimation du biovolume des cyanobactéries et des algues*, MA. 800 – Cya.alg 1.0, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, 22 p.
 - [71] Blais, S., (2002) *La problématique des cyanobactéries (algues bleu-vert) à la baie Missisquoi en 2001*. Agrosol, 13(2): p. 103-110.
 - [72] Abraxis LLC, *Microcystins Strip Test*, Product No. 520016 (5 Test), 520017 (20 Test).
 - [73] Brylinsky, M., (2012) *Evaluation of Two Test Kits for Measurement of Microcystin Concentrations*. Nova Scotia Department of the Environment.
 - [74] Abraxis LLC, *Microcystin Tube Kit*, Cat. # 520012, Instructional Booklet.
 - [75] Envirologix, *QualiTube™ Kit For Microcystin*, Catalog Number ET 022, Rev. 10-12-15.
 - [76] Beacon Analytical Systems, Inc. *Microcystin Tube Kit*, <http://www.beaconkits.com/welcome/products-page/algal-toxins/microcystin/microcystin-tube-kit/> [En ligne; accès le 27-07-2017].
 - [77] ZEULAB SL. *MICROCYSTEST KIT - Detection of microcystins in drinking and recreational water*, <http://www.zeulab.com/products.html/toxins/117-microcystest-kit.html> [En ligne; accès le 27-07-2017].
 - [78] Aranda-Rodriguez, R., Jin, Z., Harvie, J., et Cabecinha, A., (2015) *Evaluation of three field test kits to detect microcystins from a public health perspective*. Harmful Algae, 42: p. 34-42.
 - [79] Lindner, Petra, Molz, Ramona, Yacoub-George, Erwin, Dürkop, Axel, et Wolf, Hans, (2004) *Development of a highly sensitive inhibition immunoassay for microcystin-LR*. Analytica Chimica Acta, 521(1): p. 37-44.
 - [80] Covaci, O. I., Sassolas, A., Alonso, G. A., Munoz, R., Radu, G. L., Bucur, B., et Marty, J. L., (2012) *Highly sensitive detection and discrimination of LR and YR microcystins based on protein phosphatases and an artificial neural network*. Anal Bioanal Chem, 404(3): p. 711-20.
 - [81] Campàs, M., Olteanu, M. G., et Marty, J.-L., (2008) *Enzymatic recycling for signal amplification: Improving microcystin detection with biosensors*. Sensors and Actuators B: Chemical, 129(1): p. 263-267.
 - [82] Bouaïcha, N., Maatouk, I., Vincent, G., et Levi, Y., (2002) *A colorimetric and fluorometric microplate assay for the detection of microcystin-LR in drinking water without preconcentration*. Food and Chemical Toxicology, 40: p. 1677-1683.
 - [83] Heresztyn, T. et Nicholson, B.C., (2001) *Determination of cyanobacterial hepatotoxins directly in water using a protein phosphatase inhibition assay*. Water Research, 35(13): p. 3049-3056.
 - [84] Rivasseau, C., Racaud, P., Deguin, A., et Hennion, M.-C., (1999) *Development of a bioanalytical phosphatase inhibition test for the monitoring of microcystins in environmental water samples*. Analytical Chimica Acta, 394: p. 243-257.

- [85] Carmichael, W. W. et An, J., (1999) *Using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and a protein phosphatase inhibition assay (PPIA) for the detection of microcystins and nodularins*. Natural Toxins, 7(6): p. 377-385.
- [86] W., Clive J., B., Kenneth A., L., Ernest Y.C., et C., Geoffrey A., (1997) *Colorimetric protein phosphatase inhibition assay of laboratory strains and natural blooms of cyanobacteria: comparisons with high-performance liquid chromatographic analysis for microcystins*. FEMS Microbiology Letters, 153: p. 465-473.
- [87] Zhao, H., Tian, J., et Quan, X., (2013) *A graphene and multienzyme functionalized carbon nanosphere-based electrochemical immunosensor for microcystin-LR detection*. Colloids Surf B Biointerfaces, 103: p. 38-44.
- [88] Ruiyi, L., Qianfang, X., Zaijun, L., Xiulan, S., et Junkang, L., (2013) *Electrochemical immunosensor for ultrasensitive detection of microcystin-LR based on graphene-gold nanocomposite/functional conducting polymer/gold nanoparticle/ionic liquid composite film with electrodeposition*. Biosens Bioelectron, 44: p. 235-40.
- [89] Tong, Ping, Tang, Shurong, He, Yu, Shao, Yanhong, Zhang, Lan, et Chen, Guonan, (2011) *Label-free immunosensing of microcystin-LR using a gold electrode modified with gold nanoparticles*. Microchimica Acta, 173(3-4): p. 299-305.
- [90] Zhang, Jing, Lei, Jianping, Xu, Chuanlai, Ding, Lin, et Ju, Huangxian, (2010) *Carbon Nanohorn Sensitized Electrochemical Immunosensor for Rapid Detection of Microcystin-LR*. Analytical Chemistry, 82(3): p. 1117-1122.
- [91] Loyprasert, S., Thavarungkul, P., Asawatreratanakul, P., Wongkittisuksa, B., Limsakul, C., et Kanatharana, P., (2008) *Label-free capacitive immunosensor for microcystin-LR using self-assembled thiourea monolayer incorporated with Ag nanoparticles on gold electrode*. Biosens Bioelectron, 24(1): p. 78-86.
- [92] Hu, Chenlin, Gan, Nanqin, He, Zhike, et Song, Lirong, (2008) *A novel chemiluminescent immunoassay for microcystin (MC) detection based on gold nanoparticles label and its application to MC analysis in aquatic environmental samples*. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 88(4): p. 267-277.
- [93] Yu, H. W., Kim, I. S., Niessner, R., et Knopp, D., (2012) *Multiplex competitive microbead-based flow cytometric immunoassay using quantum dot fluorescent labels*. Anal Chim Acta, 750: p. 191-8.
- [94] Jang, Am, Yu, Hye-Weon, et Kim, In S., (2012) *Potential integration of cadmium lab chip with immunoassay using quantum dot/antibody probe for detection of microcystin-LR*. Desalination and Water Treatment, 33(1-3): p. 382-388.
- [95] Yu, H. W., Lee, J., Kim, S., Nguyen, G. H., et Kim, I. S., (2009) *Electrochemical immunoassay using quantum dot/antibody probe for identification of cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR*. Anal Bioanal Chem, 394(8): p. 2173-81.
- [96] Tian, Junping, Zhao, Huimin, Yuan, Fang, Quan, Xie, et Chen, Shuo, (2014) *Ultrasensitive immunoassay of microcystins-LR using G-quadruplex DNzyme as*

- an electrocatalyst*. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 94(10): p. 988-1000.
- [97] Zhu, Y., Xu, L., Ma, W., Chen, W., Yan, W., Kuang, H., Wang, L., et Xu, C., (2011) *G-quadruplex DNzyme-based microcystin-LR (toxin) determination by a novel immunosensor*. Biosens Bioelectron, 26(11): p. 4393-8.
 - [98] Herranz, S., Bockova, M., Marazuela, M. D., Homola, J., et Moreno-Bondi, M. C., (2010) *An SPR biosensor for the detection of microcystins in drinking water*. Anal Bioanal Chem, 398(6): p. 2625-34.
 - [99] Hu, C., Gan, N., Chen, Y., Bi, L., Zhang, X., et Song, L., (2009) *Detection of microcystins in environmental samples using surface plasmon resonance biosensor*. Talanta, 80(1): p. 407-10.
 - [100] Murphy, C., Stack, E., Krivelo, S., McPartlin, D. A., Byrne, B., Greef, C., Lochhead, M. J., Husar, G., Devlin, S., Elliott, C.T., et O'Kennedy, R. J., (2015) *Detection of the cyanobacterial toxin, microcystin-LR, using a novel recombinant antibody-based optical-planar waveguide platform*. Biosensors and Bioelectronics, 67(0): p. 708-714.
 - [101] Ma, W., Chen, W., Qiao, R., Liu, C., Yang, C., Li, Z., Xu, D., Peng, C., Jin, Z., Xu, C., Zhu, S., et Wang, L., (2009) *Rapid and sensitive detection of microcystin by immunosensor based on nuclear magnetic resonance*. Biosens Bioelectron, 25(1): p. 240-3.
 - [102] Taitt, C. R., Shriver-Lake, L. C., Ngundi, M. M., et Ligler, F. S., (2008) *Array Biosensor for Toxin Detection: Continued Advances*. Sensors (Basel), 8(12): p. 8361-8377.
 - [103] Vo-Dinh, T., (2007) *BioMEMS and Biomedical Nanotechnology, Volume IV: Biomolecular Sensing, Processing and Analysis*. Springer US: p. 1-20.
 - [104] Sassolas, A., Catanante, G., Hayat, A., et Marty, J. L., (2011) *Development of an efficient protein phosphatase-based colorimetric test for okadaic acid detection*. Anal Chim Acta, 702(2): p. 262-8.
 - [105] Hayat, A., Barthelmebs, L., et Marty, J. L., (2012) *A simple colorimetric enzymatic-assay for okadaic acid detection based on the immobilization of protein phosphatase 2A in sol-gel*. Appl Biochem Biotechnol, 166(1): p. 47-56.
 - [106] Wang, Wenhui, Ma, Xiaodong, Clarizia, Lisa-Jo, Wang, Xingwei, et McDonald, Melisenda, (2011) *Optical Interferometric Biosensor with PMMA as Functional Layer*. MRS Proceedings, 1133.
 - [107] Enzo Life Sciences, Inc., (2017) *PRODUCT DATA SHEET - Microcystin-LR monoclonal antibody (MC10E7) ALX-804-320*, Revised 21-Jun-17.
 - [108] Playfair, J. H. L. et Chain, B. M., (2009) *Immunology at a Glance*. At a Glance. Wiley.
 - [109] Dunn, I. S., (2010) *Searching for Molecular Solutions: Empirical Discovery and Its Future*. Wiley.
 - [110] Kai, J., Sohn, Y. S., et Ahn, C. H., (2003) *Protein microarray on cyclic olefin copolymer (COC) for disposable protein lab-on-a-chip*, in 7th International Conference on Miniaturized Chemical and Biochemical Analysis Systems Squaw Valley, California USA

- [111] Hermanson, G. T., (1996) *Bioconjugate Techniques*. Elsevier Science.
- [112] Baldini, Francesco, Carloni, Adolfo, Giannetti, Ambra, Mencaglia, Andrea, Porro, Giampiero, Tedeschi, Lorena, et Trono, Cosimo, (2008) *Optical PMMA Chip Suitable for Multianalyte Detection*. IEEE Sensors Journal, 8(7): p. 1305-1309.
- [113] Punet, X., Mauchauffe, R., Rodriguez-Cabello, J. C., Alonso, M., Engel, E., et Mateos-Timoneda, M. A., (2015) *Biomolecular functionalization for enhanced cell-material interactions of poly(methyl methacrylate) surfaces*. Regen Biomater, 2(3): p. 167-75.
- [114] Fixe, F., Dufva, M., Telleman, P, et Christensen, C. B. V., (2004) *Functionalization of poly(methyl methacrylate) (PMMA) as a substrate for DNA microarrays*. Nucleic Acids Research, 32(1 e9).
- [115] Bart, J., Tiggelaar, R., Yang, M., Schlautmann, S., Zuilhof, H., et Gardeniers, H., (2009) *Room-temperature intermediate layer bonding for microfluidic devices*. Lab Chip, 9(24): p. 3481-8.
- [116] Brown, L., Koerner, T., Horton, J. H., et Oleschuk, R. D., (2006) *Fabrication and characterization of poly(methylmethacrylate) microfluidic devices bonded using surface modifications and solvents*. Lab Chip, 6(1): p. 66-73.
- [117] Holmberg, K. et Hydén, H., (1985) *Methods of Immobilization of Proteins to Polymethylmethacrylate*. Vol. 15. 309-19.
- [118] Diaz-Quijada, G. A., Peytavi, R., Nantel, A., Roy, E., Bergeron, M. G., Dumoulin, M. M., et Veres, T., (2007) *Surface modification of thermoplastics--towards the plastic biochip for high throughput screening devices*. Lab Chip, 7(7): p. 856-62.
- [119] Varma, H.K., Sreenivasan, K., Yokogawa, Y., et Hosumi, A., (2003) *In vitro calcium phosphate growth over surface modified PMMA film*. Biomaterials, 24(2): p. 297-303.
- [120] Patel, S., Thakar, R. G., Wong, J., McLeod, S. D., et Li, S., (2006) *Control of cell adhesion on poly(methyl methacrylate)*. Biomaterials, 27(14): p. 2890-7.
- [121] Anderson, C.D. et Daniels, E.S., (2003) *Emulsion Polymerisation and Latex Applications*. Rapra Technology.
- [122] Odian, G. et Franta, E., (1994) *La polymérisation: principes et applications*. Polytechnica.
- [123] Lampman, S., (2003) *Characterization and Failure Analysis of Plastics*. ASM International.
- [124] taulman3D. (2015) *Comparision to standard PLA*, <http://taulman3d.com/in-pla-spec.html> [En ligne; accès le 2015-10-02].
- [125] Zhang, Y., Jing, H., Xu, K., Gao, C., hao, Y., Meng, F., Gui, Y., et chen, G., (2017) *Morphology control of microchannel cross-section using sacrificial spinning fiber*. MEMS 2017, Las Vegas, NV, USA, January 22-26: p. 1308-1311.
- [126] Saxena, S. K., (2004) *Polyvinyl alcohol (PVA) - Chemical and technical assessment (CTA)*. 61st JECFA: p. 1-3.
- [127] Arkema, (2009) *Plexiglas® VS acrylic resin - TDS*.
- [128] Goddard, J. M. et Hotchkiss, J. H., (2007) *Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds*. Progress in Polymer Science, 32(7): p. 698-725.

- [129] Abraham, S., Ha, C.-S., et Kim, I., (2005) *Synthesis of poly(styrene-block-tert-butyl acrylate) star polymers by atom transfer radical polymerization and micellization of their hydrolyzed polymers*. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 43(24): p. 6367-6378.
- [130] Bremner, T. et Rudin, A., (1990) *Melt Flow Index Values and Molecular Weight Distributions of Commercial Thermoplastics*. Journal of Applied Polymer Science, 41: p. 1617-1627.
- [131] SPERLING, L. H. , TAYLOR, D. W. , KIRKPATRICK, M. L. , GEORGE, H. F. , et BARDMAN, D. R. , (1970) *Glass-rubber transition behavior and compatibility of polymer pairs: Poly (ethyl acrylate) and poly (methyl methacrylate)*. Journal of Applied Polymer Science, 14: p. 73-78.
- [132] Mark, J. E., (2007) *Physical Properties of Polymers Handbook*. Second Edition. Springer.
- [133] Ur'yash, V. F., Kokurina, N. Yu, Larina, V. N., et Chuprova, S. V., (2014) *Thermodynamic characteristics and the temperatures of relaxation transitions of poly(methacrylic acid)*. Polymer Science Series A, 56(1): p. 32-39.
- [134] Harrisson, S, Davis, T. P., Evans, R. A., et Rizzardo, E., (2000) *Chain Transfer in the Sulfur-Centered Free Radical Ring-Opening Polymerization of 3-Methylene-6-methyl-1,5-dithiacyclooctane*. Macromolecules, 33(9): p. 9553-9560.
- [135] Specac, (2016) *Golden Gate™ Single Reflection. User Manual*. 2I-10500 Issue 17
- [136] Roth, A. D., (2009) *Chemical modification of polystyrene and gold surfaces (Master)*, Cornell University, Faculty of the Graduate School.
- [137] Rodiger, S., Ruhland, M., Schmidt, C., Schroder, C., Grossmann, K., Bohm, A., Nitschke, J., Berger, I., Schimke, I., et Schierack, P., (2011) *Fluorescence dye adsorption assay to quantify carboxyl groups on the surface of poly(methyl methacrylate) microbeads*. Anal Chem, 83(9): p. 3379-85.
- [138] Sano, S., Kato, K., et Ikada, Y., (1993) *Introduction of functional groups onto the surface of polyethylene for protein immobilization*. Biomaterials, 14(11): p. 817-822.
- [139] Mukhopadhyay, S. M., (2003) *Surface preparation for solid surfaces and films. CHAPTER 9: SAMPLE PREPARATION FOR MICROSCOPIC AND SPECTROSCOPIC CHARACTERIZATION OF SOLID SURFACES AND FILMS*. Department of Mechanical and Materials Engineering, Wright State University, Dayton, Ohio: p. 377-411.
- [140] Louette, P., Bodino, F., et Pireaux, J.-J., (2005) *Poly(methyl methacrylate) (PMMA) XPS Reference Core Level and Energy Loss Spectra*. Surface Science Spectra, 12(1): p. 69-73.
- [141] Filabot. (2018) *FILABOT ORIGINAL FILAMENT EXTRUDER FB00071*, <https://www.filabot.com/collections/filabot-core/products/filabot-original> [En ligne; accès le 2018-03-17].
- [142] Centre de Technologie Minérale et de Plasturgie inc. (2018) *Catalogue - Équipements de laboratoire*, http://www.ctmp.ca/wp-content/uploads/2017/02/Catalogue.Web_pro.pdf [En ligne; accès le 2018-03-17].

- [143] HYREL 3D. (2017) SYSTEM 30M, <http://www.hyrel3d.com/core-suystems/system-30m/> [En ligne; accès le 2017-09-16].
- [144] Tannenbaum, R., King, S., Lecy, J., Tirrell, M., et Potts, L., (2004) *Infrared Study of the Kinetics and Mechanism of Adsorption of Acrylic Polymers on Alumina Surfaces*. Langmuir, 20: p. 4507-4514.
- [145] Ndazi, B. S. et Karlsson, S., (2011) *Characterization of hydrolytic degradation of polylactic acid/rice hulls composites in water at different temperatures*. Express Polymer Letters, 5(2): p. 119-131.
- [146] Al-Itry, R., (2012) *Blends based on poly(lactic acid) : structure / rheology / processing relationship. Other*. INSA de Lyon, English, <NNT : 2012ISAL0116>, <tel-00876617>.
- [147] Varadwaj, P. K. et Lahiri, T., (2009) *Functional group based ligand binding affinity scoring function at atomic environmental level*. Bioinformation, 3(6): p. 268-274.
- [148] Moussaif, N., Pagnoulle, C., Riga, J., et Jérôme, R., (2000) *XPS analysis of the PC/PVDF interface modified by PMMA. Location of the PMMA at the interface*. Polymer, 41: p. 3391-3394.
- [149] Gruian, C., Vanea, E., Simon, S., et Simon, V., (2012) *FTIR and XPS studies of protein adsorption onto functionalized bioactive glass*. Biochim Biophys Acta, 1824(7): p. 873-81.
- [150] Lambert, J. B., Shurvell, H. F., Lightner, D. A., et Cooks, R. G., (1998) *Organic Structural Spectroscopy* ed. P.E. Limited.
- [151] Feng, C. L., Vancso, G. J., et Schönherr, H., (2005) *Interfacial reactions in confinement: kinetics and temperature dependence of the surface hydrolysis of polystyrene-block-poly(tert-butyl acrylate) thin films*. Langmuir, 21: p. 2356-2363.
- [152] Hwang, S. Y., Kumada, Y., Seong, G. H., Choo, J., Katoh, S., et Lee, E. K., (2007) *Characteristics of a liposome immunoassay on a poly(methyl methacrylate) surface*. Anal Bioanal Chem, 389(7-8): p. 2251-7.